



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**ENKAPSULACE AKTIVNÍCH LÁTEK A JEJICH APLIKACE
V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU**

ENCAPSULATION OF ACTIVE COMPONENTS AND THEIR APPLICATIONS IN FOOD INDUSTRY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Hana Malčíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1306/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Hana Malčíková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Enkapsulace aktivních látek a jejich aplikace v potravinářském průmyslu

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Screening na trhu dostupných doplňků stravy pro dětskou výživu s obsahem řas a mastných kyselin
- 2) Příprava a charakterizace extraktů z řas a vybraných potravin
- 3) Enkapsulace připravených extraktů a zvolených aktivních látek
- 4) Návrh optimálního složení dětských doplňků stravy s obsahem řas a mastných kyselin

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Hana Malčíková
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na vývoj doplňků stravy s obsahem řas a vybraných aktivních látek pro dětskou výživu. Jako vhodné byly pro tyto aplikace vybrány řasy arame, kombu, wakame, hijiki a chlorella, dále spirulina, lněné semínko, konopné semínko a vlašský ořech.

Teoretická část se zabývá tematikou dětské výživy, dále popisuje charakter vybraných superpotravin a v neposlední řadě obsahuje screening na trhu dostupných dětských doplňků stravy s obsahem omega-3 mastných kyselin.

V experimentální části byla nejprve provedena optimalizace vhodného typu extrakce. Poté byl u zvolených extraktů superpotravin stanoven obsah polyfenolů, flavonoidů a antioxidantů. U vzorků byl rovněž stanoven obsah karotenoidů a chlorofylů. Z extraktů byly dále připraveny lipozomy, u kterých byla stanovena velikost, stabilita měřením zeta potenciálu, enkapsulační účinnost a dlouhodobá stabilita po třech měsících skladování. Celkově lze konstatovat že u většiny lipozomů se podařilo enkapsulovat aktivní látky s účinností nad 80 % a připravené částice vykazovaly i velmi dobrou stabilitu. Z hlediska dlouhodobé stability vykazovaly některé vzorky lipozomů nižší stabilitu a bylo zaznamenáno uvolnění aktivních látek během skladování. Pro prodloužení trvanlivosti těchto vzorků by však bylo možné využít lyofilizace. Za účelem vykreslení nutričního profilu byly vzorky superpotravin použity i k analýze celkového obsahu sacharidů, proteinů, lipidů a k určení profilu mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.

Na závěr byla provedena senzorická analýza vytvořených doplňků stravy obohacených o extrakty řas a oleje s vyšším obsahem ω -3 mastných kyselin. Nejlépe byl vyhodnocen vzorek s označením F01, který obsahoval aktivní láky z řasy wakame.

Klíčová slova: enkapsulace, řasy, lipozomy, dětská výživa, profil mastných kyselin

ABSTRACT

The Diploma thesis is focused on development of children's nutrition supplements containing algae and selected active substances. Arame, kombu, wakame, hijiki and chlorella algae, as well as spirulina, flaxseed, hemp seed and walnut were chosen as suitable for these applications.

The theoretical part introduces topic of children food, further it describes the nature of selected superfoods and last but not least it contains screening of available children's food supplements containing omega-3 fatty acids on the market. In the experimental part, an optimization of the appropriate type of extract was made. Then the content of polyphenols, flavonoids and antioxidants was determined for the selected superfood extracts. A content of carotenoids and chlorophylls was also assayed. Furthermore, liposomes were prepared from the extracts. There have been determined a size, stability by measuring zeta potential, encapsulation efficiency and long-term stability after three months. Overall, the majority of liposomes were able to encapsulate active substances with an efficiency of over 80 % and the prepared particles showed very good stability too. In terms of long-term stability, some liposome samples exhibited lower stability and a release of active substances during storage was observed. However, lyophilization could be used to prolong the durability of these samples. In order to illustrate the nutritional profile, the superfood samples were also used to analyze total carbohydrate, protein and lipid content and to determine the fatty acid profile by gas chromatography.

Finally, a sensory analysis of prepared alginate supplements containing algae and oils extracts with a higher content of omega-3 fatty acids was performed. The F01-labeled sample containing active substances of wakame algae, was evaluated as the best one.

Key words: encapsulation, algae, liposomes, childrens food, a fatty acids profile

MALČÍKOVÁ, Hana. *Enkapsulace aktivních látek a jejich aplikace v potravinářském průmyslu*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113486>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Petra Matoušková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem FCH VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkanem FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení při práci na experimentální části, vstřícnost a trpělivost. Dále děkuji za rady a poskytnutý čas během zpracování této diplomové práce své konzultantce Ing. Julii Hoové. Nakonec bych chtěla poděkovat rodině, přátelům a partnerovi za projevenou podporu.

OBSAH

1	Úvod	11
2	Teoretická část	12
2.1	Dětská výživa	12
2.2	Vybrané superpotraviny	13
2.2.1	Řasy	14
2.2.1.1	Chlorella	14
2.2.1.2	Spirulina	14
2.2.1.3	Hijiki	14
2.2.1.4	Arame	15
2.2.1.5	Kombu	15
2.2.1.6	Wakame	15
2.2.2	Vlašský ořech	15
2.2.3	Konopné semínko	16
2.2.4	Lněné semínko	16
2.3	Lipidy	17
2.3.1	Mastné kyseliny	17
2.3.1.1	Nasyčené mastné kyseliny	18
2.3.1.2	Mononenasycené mastné kyseliny	19
2.3.1.3	Polynenasycené mastné kyseliny	19
2.3.1.4	Biosyntéza mastných kyselin	19
2.4	Enkapsulace	21
2.4.1	Obalové materiály	21
2.4.1.1	Polysacharidové obalové materiály	21
2.4.1.2	Lipidové obalové materiály	23
2.4.2	Metody enkapsulace	23
2.4.2.1	Sprejové sušení	23
2.4.2.2	Sprejové chlazení a mražení	23
2.4.2.3	Lyofilizace	24

2.4.2.4	Extruze.....	24
2.4.2.5	Koacervace	24
2.4.2.6	Inkluze	24
2.4.2.7	Emulgace	24
2.4.2.8	Tvorba lipozomů.....	25
2.5	Kapalinová chromatografie.....	25
2.6	Plynová chromatografie	26
2.7	Screening trhu dětských doplňků stravy s obsahem řas a omega-3 mastných kyselin	27
3	Cíle práce	29
4	Experimentální část	30
4.1	Použité chemikálie, mikroorganismy a přístroje	30
4.1.1	Chemikálie	30
4.1.2	Použité přístroje a pomůcky	30
4.1.3	Použité mikroorganismy	31
4.2	Extrakce	31
4.2.1	Extrakce vodných a ethanolových vzorků.....	32
4.2.2	Extrahování olejů pomocí automatického přístroje Soxtherm	32
4.3	Charakterizace extraktů.....	32
4.3.1	Stanovení celkových polyfenolů.....	33
4.3.2	Stanovení celkových flavonoidů.....	33
4.3.3	Stanovení antioxidační aktivity	33
4.4	Příprava a charakterizace lipozomů	33
4.4.1	Určení velikosti a stability připravených částic	33
4.4.2	Stanovení enkapsulační účinnosti a dlouhodobé stability lipozomů	34
4.5	Stanovení celkového dusíku metodou dle Kjeldahla	34
4.6	Stanovení celkových sacharidů podle Duboise	35
4.7	Určení profilu mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.....	35
4.8	Antimikrobiální testy	36
4.9	Stanovení obsahu karotenoidů a chlorofylů	36

4.10	Analýza obsahu pigmentů pomocí HPLC	37
4.11	Příprava dětských doplňků stravy s obsahem řas a mastných kyselin	38
5	Výsledky a diskuze	39
5.1	Optimalizace a charakterizace vodných a ethanolových extraktů	39
5.1.1	Polyfenoly a flavonoidy	39
5.1.2	Antioxidační aktivita	44
5.2	Charakterizace lipidových extraktů	47
5.3	Příprava a charakterizace lipozomů	48
5.3.1	Určení velikosti a stability lipozomů	48
5.3.2	Charakterizace a enkapsulační účinnost lipozomů	50
5.3.3	Dlouhodobá stabilita lipozomů	52
5.4	Stanovení obsahu bílkovin pomocí Kjeldahlovi metody	55
5.5	Stanovení celkových sacharidů podle Duboise	56
5.6	Stanovení celkového obsahu lipidů vážkovou metodou	56
5.7	Určení profilu mastných kyselin	57
5.8	Antimikrobiální testy	64
5.9	Spektrofotometrické stanovení obsahu karotenoidů a chlorofylů	66
5.10	Analýza obsahu pigmentů pomocí HPLC	67
5.11	Senzorická analýza	68
5.11.1	Návrh finálního podoby doplňku stravy	71
6	Závěr	72
7	Seznam použité literatury	74
8	Seznam zkratk	78
9	Přílohy	80

1 ÚVOD

Mohlo by se zdát, že v nynější době plné pokroků v medicíně díky neustálému výzkumu a vývoji bude všem zajištěn příjem potřebných živin, vitamínů, minerálů a dalších bioaktivních látek, nicméně pravda je taková, že se neustále setkáváme s přibývajícím počtem civilizačních onemocnění, způsobených právě nedostatkem těchto látek. V okamžiku zjištění onemocnění se většina jedinců v první chvíli obrátí k suplementaci. Na trhu je nyní k dispozici nekonečná škála produktů, které je možno užívat za účelem zlepšení zdravotní kondice, fyzické kondice, nebo ke kosmetickým účelům.

Růst a vývoj dítěte je ovlivněn zpočátku stravou matky, po narození stravou jeho vlastní. Správná výživa je podstatná pro vývoj jednotlivých systémů a jejich funkcí, a proto není neobvyklá ani suplementace vitamínů a jiných biologicky aktivních látek u dětí.

Cílem diplomové práce je vývoj a charakterizace doplňků stravy s obsahem řas a vybraných aktivních látek pro dětskou výživu a screening na trhu dostupných doplňků stravy pro dětskou výživu s obsahem řas a mastných kyselin. A to především ω -3 i ω -6 mastných kyselin, které jsou esenciální v oblasti lidské výživy. Vzhledem k charakteru diplomové práce byly tedy zvoleny potraviny s vyšším obsahem mastných kyselin a dalších bioaktivních látek. Zvolenými superpotravinami byly zvoleny řasy chlorella, spirulina, kombu, hijiki, arame, wakame, semínko lněné a konopné a ořechy vlašské.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Dětská výživa

Dítě je již od samotného početí konzumentem a jeho růst a vývoj je ovlivněn zpočátku stravou matky, po narození stravou jeho vlastní. Správná výživa je podstatná pro průběh metabolismu jedince a vývoj jednotlivých systémů a jejich funkcí [1]. Organismus potřebuje dostatečné množství energie, živin, minerálů a vitamínů. Hlavním zdrojem energie jsou sacharidy a lipidy, vyšší nároky jsou kladeny na příjem kvalitních bílkovin, vápníku a železa [1].

Je potřeba si uvědomit, že potřeby výživy dítěte a dospělého člověka jsou rozlišné jak v kvantitě, tak kvalitě stravy [2]. Existuje několik vývojových fází v životě dítěte, přičemž každá tato fáze vyžaduje jiný příjem energie, živin a vody [2]. Tato období jsou uvedena v následující Tabulce 1.

Tabulka 1: Vývojové fáze dítěte [2]

VÝVOJOVÁ FÁZE DÍTĚTE	ČASOVÉ ROZMEZÍ
Nitroděložní vývoj	Donošený plod 280 +/- 14 dní
Novorozenec	28 dní
Kojenec	Do 1. roku
Batole	Do 3. roku
Předškolní věk	Do 5. roku
Školní věk mladší a starší	Do 12 let mladší, do 14 let starší
Adolescence	Do 18 let

Nejvýraznější změny probíhají ještě v době nitroděložního vývoje dítěte. Velký význam má strava těhotné ženy. Následně je mateřské mléko nejlepším zdrojem všech složek výživy v prvních šesti měsících života kojence. U starších dětí je nutné zajistit vyšší příjem minerálních látek a vitamínů. Proto se do jídelníčku dítěte postupně přidává zelenina, ovoce a v další fázi obiloviny. Z obilovin získávají sacharidy, vitamín B a vlákninu. Batole má nižší potřebu energie, za to však rozvoj svalové a kostní tkáně vyžaduje dostatečný příjem kvalitních bílkovin, ale i vápníku a fosforu. Pro imunitní systém je pak nutný dostatečný příjem železa a zinku. V předškolním věku se opět mírně zvyšují nároky na energii, dále je zvýšená potřeba vápníku, železa, vitamínů – hlavně A a C. Maso, masné výrobky, obiloviny, luštěniny pokrývají vyžadované množství ostatních vitamínů. Pro školní věk je charakteristické lehké snížení potřeby energie, ale stále je nutný dostatečný přísun vápníku, železa, jódu a vitamínu C. V dospívání se potřeba energie opět zvyšuje, zvyšuje se také potřeba bílkovin, minerálních látek a vitamínů. Zřejmé jsou intersexuální rozdíly metabolismu. Dívky potřebují spíše vápník a železo, chlapci zase energii a vitamíny skupiny B[2]. Referenční hodnoty potřeby energie a živin v závislosti na věku uvádí následující Tabulka 2.

Tabulka 2: Referenční hodnoty energie a významných živin u dítěte v průběhu vývoje od 1. roku [4]

Energie, živiny	VĚK					
	1. – 3. rok	4. – 6. rok	7. – 9. rok	10. – 12. rok	13. – 14. rok	15.–18. rok
Energie (kcal/kg/den) m/ž	100	90	75	60/55	55/45	45/40
Bílkoviny (g/kg/den) m/ž	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	0,9–0,8
Tuky (% denní potřeby E)	30–35	30–35	30–35	30–35	30–35	30–35
EMK (% denní potřeby E)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Vitamin A (mg/den) m/ž	0,6	0,7	0,8	0,9	1,1/1,0	1,1/0,9
Vitamin D (μg/den)	5	5	5	5	5	5
Vitamin K (μg/den) m/ž	15	20	30	40	50	70/60
Vitamin B6 (mg/den) m/ž	0,9	1,2	1,4	1,6/1,5	1,8/1,6	2,1/1,8
Vitamin B12 (μg/den) m/ž	1,0	1,5	1,8	2,0	3,0	3,0
Kyselina listová (μg/den)	120	160	200	240	300	300–400
Vitamin C (mg/den)	55	60	65	70	75	75

Jakmile dochází po půlroce života dítěte k rozvoji pohybu, zvyšuje se množství tukuprosté tkáně na úrok tkáně tukové, pro růst svalové hmoty a kostní tkáně je vyžadován, jak již bylo zmíněno, zvýšený příjem živočišné bílkoviny, vápníku, fosforu atd. Proto je v tomto dětském věku nutný dostatečný příjem mléka a mléčných výrobků s vysokým obsahem zmíněných nutrientů [2]. Potřebné jsou tedy bílkoviny, zejména pak jejich složka taurin u menších dětí; dále pak železo, zinek, měď, jód, selen, vitamín A, cholin a kyselina listová.

Je důležité si uvědomit, že somatický vývoj dítěte probíhá nerovnoměrně a v tomto ohledu jsou podstatné především změny CNS. Nejrychlejší vývoj mozku je zaznamenán do 3. roku dítěte. Při nedostatečném množství potřebných nutrientů může dojít k nesprávnému vývoji. Z toho důvodu je potřeba zajistit dostatečný přísun nenasycených mastných kyselin. Příjem ω -3 MK se pak podílí na vývoji a správné funkci mozku i v pozdějších fázích [2]. Tato diplomová práce se proto zabývá vývojem doplňků stravy se zvýšeným obsahem ω -3 mastných kyselin pro zajištění správného vývoje dítěte. Bohatým zdrojem ω -3 mastných kyselin jsou mnohá semínka a ořechy, např. semínko lněné a konopné, z ořechů například ořechy vlašské, kešu a další. Zvoleným superpotravinám s vhodným zastoupením mastných kyselin a dalších látek se věnuje následující kapitola.

2.2 Vybrané superpotraviny

Vzhledem k charakteru diplomové práce byly zvoleny potraviny s vyšším obsahem mastných kyselin, které jsou navíc bohatým zdrojem dalších bioaktivních látek.

ω -3 i ω -6 mastné kyseliny jsou esenciální živiny v oblasti lidské výživy. Mezi důležité zdroje ω -6 nenasycených mastných kyselin patří maso, cereální výrobky, zelenina, ořechy a semínka. Mezi významné zdroje ω -3 mastných kyselin pak patří především mořské plody [5].

Pro experimentální část této práce byly zvoleny řasy chlorella, spirulina, kombu, hijiki, arame, wakame, semínko lněné a konopné a ořechy vlašské, které jsou dále blíže specifikovány.

2.2.1 Řasy

Řasy jsou fylogeneticky rozlišné organismy. Zařazují se mezi nižší rostliny. Jedná se o autotrofní, jednobuněčné i mnohobuněčné rostliny bez diferenciacie pletiv. K řasám patří sladkovodní i mořské rody. Vyskytují se jak mikroskopičtí zástupci, tak rody dorůstající i několikametrové délky. Jejich barva je dána různými pigmenty a podílí se na taxonomickém rozdělení [6][5][7].

Sušené mořské řasy jsou bohaté na bílkoviny, minerály, vlákninu, fenolické sloučeniny a mají nízký obsah tuku s obsahem polynenasycenými mastnými kyselinami. Jejich chemické složení se liší v závislosti na druhu, zeměpisné situaci, období sklizně nebo okolních podmínkách [8].

2.2.1.1 *Chlorella*

Chlorella je jednobuněčná mikrořasa s biologickými a farmakologickými vlastnostmi důležitými pro lidské zdraví. Obsahuje komplex esenciálních nutrientů, je bohatým zdrojem proteinů, poskytuje sacharidy a omega-3 polynenasycené mastné kyseliny, minerály, vitamíny i antioxidanty [9][10].

Klinické studie naznačují, že suplementací *Chlorelly vulgaris* může dojít ke zlepšení hyperlipidemie i hyperglykémie [10].

2.2.1.2 *Spirulina*

Vláknitá mnohobuněčná mikrořasa Spirulina je považovaná za bohatý zdroj bílkovin, vitamínů, aminokyselin, minerálů a dalších živin. Byl také prokázán její pozitivní účinek při léčbě některých alergií, rakoviny, hyperglykémie a hyperlipidémie a jiných onemocnění [11].

Běžně se používá ve farmaceutických a potravinářských výrobcích [11].

2.2.1.3 *Hijiki*

Hijiki (*Sargassum fusiforme*) je hnědá mořská řasa, která se v Japonsku sklízí počátkem roku, a poté se suší, vaří a znovu vysuší. Hijiki má příjemnou strukturu a mírnou, ořechovou chuť [12].

Hijiki obsahuje 12,2 % bílkovin a 1,8 % lipidů. Obsah bílkovin a popílku je o něco nižší než u ostatních jedlých mořských řas, ale obsah celkové vlákniny, který činí 11,4 %, je vyšší, což má pozitivní dopad zejména na trávicí soustavu. Bohužel, Hijiki obsahuje vysoké množství arzenu, což je nutno omezit před spotřebou [12].



Obrázek 1: Hijiki

2.2.1.4 Arame

Arame (*Ecklonia bicyclis*) je hnědá řasa sklízená podél pobřeží Pacifiku u Japonska. Nejprve se suší na slunci, pak se připravuje několik hodin na páře nebo vaří, nakrájí se na proužky a opět usuší. Vysušená arame má velmi tmavou barvu, ale když se namočí do vody, získá tmavě hnědou barvu. Chutí jsou si podobné s hijiki, ale arame je méně slaná [13].

2.2.1.5 Kombu

Kombu patří ke skupině hnědých řas Laminariaceae. Nutričně důležitý je obsah vlákniny, který činí 30–40 %. Vykazuje protinádorovou, antivirovou, antikoagulační a antitrombotickou aktivitu. Obsahuje vysoké množství minerálů jako je vápník, železo, jód a draslík [14].

2.2.1.6 Wakame

Obsahuje přibližně 20 % proteinů a značné množství vlákniny. Ačkoliv je obsah lipidů 1,1 % nízký, jsou tyto řasy bohaté na polynenasycené mastné kyseliny [12].



Obrázek 2: Wakame

2.2.2 Vlašský ořech

Ořechy jsou definovány jako suché plody skládající se z nejedlé tvrdé skořápky a semena [15].

Jedná se o bohaté zdroje bioaktivních látek typu proteiny, uhlovodíky, tuky a některých mikronutrientů jako draslík, měď, vápník nebo hořčík. Obsahují též významné množství vlákniny a vitamínu C a E. Obecně obsahují antioxidanty jako flavonoidy, tokoferoly nebo polyfenoly [16].

Je potřeba dbát na skladovatelnost ořechů. Ořechy se totiž vyznačují vysokým obsahem olejů a rozsáhlým podílem mastných kyselin, což má za následek oxidační žluknutí a rychlé zhoršení kvality. Stabilnější jsou ořechy s obsahem mononenasycených mastných kyselin [16].

Mononenasycené kyseliny činí ořechy nutričně cennou nicméně k autooxidaci náchylnou potravinou. Při oxidaci lipidů dochází k produkci sekundárních produktů indikujících zhoršení kvality. Příkladem těchto látek jsou karbonylové sloučeniny nebo furany [16].

Polynenasycené esenciální mastné kyseliny jako je kyselina linolová či linolenová se pozitivně projevují na zdraví člověka a dělají tak z ořechů vhodnou alternativu tučných potravin. Vlašské ořechy jsou dále charakteristické zvláště vysokou hladinou antioxidantů, které pomáhají regulovat hladinu cholesterolu v krvi [16].

Vedle pozitivních účinků na kardiovaskulární systém může mít konzumace ořechů v některých případech negativní dopady. Ořechy způsobují alergické reakce. Tato potravinová alergie je běžná a často vyvolává závažné zdravotní potíže [15].

Vlašské ořechy patří k čeledi ořešákovité z řádu bukotvaré. Pěstují se po celém světě, zejména však v oblasti mírného klimatického pásu. Konzumace jader vlašských ořechů patří z důvodu obsahu polynenasycených mastných kyselin a antioxidantů ke zdravé vyvážené stravě. Bohužel alergie na vlašské ořechy patří k velmi běžným ořechovým alergiím [17].

2.2.3 Konopné semínko

Konopí seté (*cannabis sativa*) je jednoletá rostlina čeledi konopovité (cannabaceae). Rozlišujeme dva typy a) s obsahem THC – marihuana, b) s nízkým obsahem THC (<0,3 %) - technické konopí [18].

Konopné semeno obsahuje více než 30 % oleje, až 30 % sacharidů a 25 % bílkovin, přičemž součástí bílkovin jsou i esenciální aminokyseliny v množství odpovídajícím doporučení WHO pro 2leté až 5leté děti. Semena jsou bohatá na nenasycené mastné kyseliny, hlavně kyselinu alfa-linolenovou a linolovou [19][20].

Konopný olej získávaný ze semen je tvořen z více než 80 % PUFA, je tmavé barvy a bohatý na různé antioxidanty [20].

Konzumace konopných semen má příznivý účinek na hladinu LDL cholesterolu a krevního tlaku. Konopné semeno obsahuje též významné množství argininu, který je prekurzorem oxidu dusnatého využívaného jako signální látka v kardiovaskulárním systému a podílí se na regulaci hemostázy [19].

2.2.4 Lněné semínko

Len setý (*linum usitatissimum*) je jednoletá rostlina čeledi lnovité (linaceae). Jdne se o rostlinu s bílými a modrofialovými květy, jednoduchými listy. Plodem je tobolka obsahující až 10 semen [18].

Samotná semínka jsou oválná a asi 6 mm dlouhá. Mají hladký, lesklý povrch hnědé barvy [18].

Lněné semeno obsahuje až 20 % proteinů, esenciální aminokyseliny jako lysin, leucin, methionin a valin, dále vysoký obsah vlákniny a značné množství tvoří olej (až 45 %). Len je považován za významný rostlinný zdroj ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny alfa-linolenové [21]. Alfa-linolenová kyselina obsažená ve lněném semeni má schopnost redukovat cholesterol v tkáni a inhibovat produkci derivátů eikosanoidů z kyseliny arachidonové, což působí preventivně vůči nádorovým onemocněním. Slizové látky semen působí pozitivně na trávicí proces a chrání sliznici žaludku [21].

2.3 Lipidy

Lipidy jsou látky, které se vyskytují napříč všemi živými organismy. Nacházejí se v buňkách, kde tvoří buněčné struktury a poskytují energetické zásoby pro biologické procesy. Jsou definovány podle rozpustnosti, jelikož chemická struktura a funkce jednotlivých lipidů je rozlišná [22].

Mezi lipidy řadíme nejrozličnější organické sloučeniny včetně tuků, olejů, hormonů a některých složek membrán. Společnou charakteristikou těchto látek je že nedochází ke vzájemné interakci s vodou [24].

Jeden typ látek řadících se mezi lipidy, triacylglyceroly, se v tukových buňkách odděluje formou tuku a slouží jako energetická zásoba organismu a zároveň zajišťuje tepelnou izolaci. Jiné lipidy, např. steroidní hormony, slouží jako chemické posly buněk, tkání a orgánů, další zajišťují komunikaci biochemických systémů uvnitř buňky [24].

Lipidy jsou na rozdíl od proteinů, sacharidů a nukleových kyselin hydrofobního charakteru. Některé z nich však mohou obsahovat část hydrofilní struktury. Tyto amfifilní lipidy vykazují jedinečné chování ve vodném prostředí: spontánně tvoří organizované molekulární agregáty, jejichž hydrofilní konce se stýkají s vodou a hydrofobní konce jsou na vnitřní straně, kde jsou před vodou chráněny. Díky této schopnosti mohou tvořit podstatné složky buněčných a organelových membrán. Buněčné membrány jsou tvořeny dvouvrstvou fosfolipidů. Separují buňky od prostředí a rozdělují vnitřní prostory buněk do speciálních struktur se specifickými funkcemi. Lipidy jsou tvořeny spojením malých konstitučních molekul. Mnoho těchto stavebních molekul je tvořeno stejnou či homologní strukturou. To umožňuje rozdělit lipidy na následující hlavní skupiny: mastné kyseliny a jejich deriváty, cholesterol a jeho deriváty a lipoproteiny [24].

2.3.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou alifatické monokarboxylové kyseliny. Většina přirozených mastných kyselin má řetězec o délce 4–22 uhlíků, obvykle 18 [23]. Hlavními strukturálními znaky mastných kyselin jsou délka řetězce, přítomnost nenasycenosti a substituční skupiny [22].

Málokdy se mastné kyseliny vyskytují samostatně, obvykle jsou součástí komplexních lipidických molekul jako jsou tuky a fosfolipidy. Většina biologických mastných kyselin obsahuje sudý počet uhlíků kvůli biosyntetickému propojování dvouuhlíkatých jednotek. Ačkoliv je tato molekula ve vodě

nerozpuštná, což způsobuje hydrofobní charakter uhlovodíkového řetězce, záporně nabitý karboxylát je hydrofilní. Tato forma vyskytující se u všech biologických lipidů se nazývá amfipatická [24].

Mastné kyseliny mohou vedle přímého uhlovodíkového řetězce obsahovat též dvojice uhlovodíků spojených dvojnými vazbami, methylové větve či cyklopropanový kruh. Důležitými deriváty mastných kyselin jsou triglyceridy, vosky a lipidy biologických membrán jako steroly, glycerofosfolipidy a sfingolipidy [24].

Rozlišujeme mastné kyseliny nasycené a nenasycené, přičemž nenasycené kyseliny se dělí na mono- a polynenasycené.

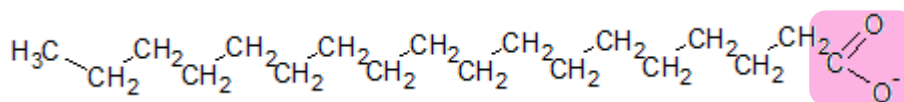
2.3.1.1 Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny neobsahují dvojnou vazbu uvnitř svého uhlovodíkového řetězce [25]. Jsou tvořeny homologní sérií monokarboxylových kyselin. Přirozeně se vyskytující nasycené kyseliny mají délku řetězce převážně mezi 4–24 uhlíky [24].

Kyseliny s krátkým řetězcem, jako je kyselina máselná, se nachází převážně v mléčném tuku přežvýkavců. Kyseliny se střední délkou řetězce se vyskytují společně v kokosovém a palmojádrovém oleji. V obou těchto olejích převládá zejména zastoupení kyseliny laurové [23][22].

Nejrozšířenější přirozeně se vyskytující nasycenou mastnou kyselinou je bezpochyby kyselina palmitová. Její přítomnost byla prokázána v rostlinách, živočiších i mikroorganismech. Například palmový olej je velmi bohatý zdroj s obsahem vyšším než 40 % kyseliny palmitové [23].

Kyselina stearová, která se nachází na *Obrázek 3*, je také hojně přítomná, nicméně obvykle se objevuje v nízkých koncentracích s výjimkou kakaového másla a několika živočišných tuků [23].



Uhlovodíkový řetězec

karboxylová skupina

Obrázek 3: kyselina stearová

Nasycené kyseliny jsou jednoduše získatelné hydrogenací snadno dostupných nenasycených kyselin. Zkracování a prodlužování řetězce jsou reakce umožňující přístup ke kyselinám s lichým i sudým počtem uhlíků, které nejsou v přírodě snadno k nalezení [23].

Nejjednodušší mastné kyseliny jsou lineární řetězce bez větvení, spojené jednoduchými vazbami uhlík-uhlík s jednou koncovou skupinou karboxylové kyseliny. Termín nasycené znamená, že všechny uhlíky v molekule jsou spojeny s maximálním možným počtem vodíků [24].

Kyseliny nenasycené mají ve svém řetězci 1 či více dvojných vazeb uhlík-uhlík. Termín nenasycené znamená, že není navázán maximální možný počet vodíkových atomů na každý uhlíkový atom v molekule. Počet dvojných vazeb indikuje obecný název – mononenasycené mastné kyseliny pro molekuly s 1 dvojnou vazbou nebo polynenasycené mastné kyseliny se dvěma a více dvojnými vazbami v molekule. Dvě možné kombinace, cis a trans, určují dvěma methylovými skupinami sousedící s uhlíky vázanými dvojnou vazbou. Konfigurace cis se vyskytuje v biologicky nenasycených

mastných kyselinách, dva sousední uhlíky v této konformaci leží na stejné straně uhlíků vázaných dvojnou vazbou. V konfiguraci trans se sousední uhlíky nacházejí na protilehlých stranách vazebných uhlíků [24].

2.3.1.2 Mononenasycené mastné kyseliny

Ačkoliv bylo identifikováno více než sto přirozeně se vyskytujících mononenasycených mastných kyselin, většina z nich je extrémně vzácná. Obecně se nejčastěji vyskytují sloučeniny s počtem 16-22 uhlíků v řetězci s dvojnou vazbou v konfiguraci cis, které se vyskytují v běžných lipidech a olejích [22]. Trans – monoenoové kyseliny tvoří vzácné složky přírodních olejů a tuků [25].

Nejběžnější mononenasycenou kyselinou je kyselina olejová. Nachází se ve většině rostlinných i živočišných lipidů a je jednou z hlavních mastných kyselin olivového oleje a několika ořechových olejů, např. u makadamových, pekanových a lískových ořechů, pistácií a mandlí tvoří obsah kyseliny olejové 50–70 % [24].

2.3.1.3 Polynenasycené mastné kyseliny

Polynenasycené mastné kyseliny se objevují v nižším zastoupení. Dvojně vazby jsou téměř vždy odděleny methylovými skupinami, což je výsledkem biosyntetického mechanismu, kterým jsou dvojně vazby včleněny do řetězce [22]. Nejznámějšími polynenasycenými kyselinami jsou kyselina linoleová a arachidonová. Kyselina arachidonová je známá zejména jako prekursor eikosanoidů, které zahrnují prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny. Tyto sloučeniny produkovány buňkami za určitých podmínek, mají podstatné fyziologické vlastnosti [24]. Významné polynenasycené mastné kyseliny jsou omega-3 a omega-6 polynenasycené mastné kyseliny, které tvoří většinu membránových fosfolipidů. Důležitý je příjem Omega-3 eicosapentaenové (EPA) a dokosaheptaenové kyseliny (DHA). Lidé tyto mastné kyseliny dokáží syntetizovat pouze ve velmi nízké koncentraci a jsou odkázáni na jejich příjem z potravy, přičemž hlavním zdrojem jsou mořské plody [25].

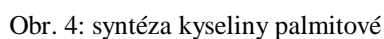
2.3.1.4 Biosyntéza mastných kyselin

Z jejich struktury bývá patrný jejich biosyntetický původ – výstavba řetězce probíhá připojením dvouuhlíkatých jednotek s výskytem cis dvojně vazby na specifické pozici a s ohledem na umístění karboxylové skupiny [23].

Syntéza mastných kyselin probíhá v cytosolu buněk, zejména v tukové tkáni. K přenosu acylové skupiny slouží esterově vázaný „acyl carrier protein“ (též ACP). Tento protein se vyskytuje ve formě multienzymového komplexu, na kterém probíhá syntéza [22][26].

Biosyntéza mastných kyselin má anabolický charakter a začíná syntézou energeticky bohaté dvouuhlíkaté jednotky malonyl-CoA. V prvním kroku syntézy dochází ke kondenzaci s acetyl-CoA, který vzniká po odbourání jiných mastných kyselin, oxidační dekarboxylací pyruvátu případně z některých aminokyselin [26].

Schematické znázornění biosyntézy mastných kyselin je uvedeno na příkladu tvorby kyseliny palmitové na následujícím Obr. 4.

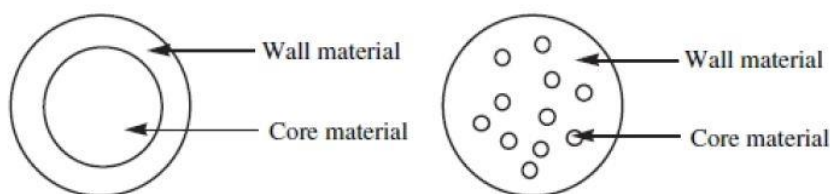


2.4 Enkapsulace

Enkapsulace, též zapouzdření, je metoda, která využívá zachycení aktivních látek do nosného materiálu za účelem transportu aktivních látek na požadované místo. Kapsule vznikající v průběhu procesu tvoří bariéru mezi výplní a okolím a za daných podmínek dochází k postupnému uvolňování obsahu. Částice mohou mít rozměry od několika nanometrů až po milimetry [27].

Aktivní látka, která se enkapsuluje tvoří jádro kapsule. Může se jednat o látky různého charakteru, např. vitamíny, antioxidanty, probiotika, enzymy, přírodní extrakty apod. Často se metoda enkapsulace volí z důvodu nízké stability zmíněných aktivních látek v prostředí, například při jejich zpracování, nebo při jejich skladování [27].

Existuje vícero typů částic, nicméně nejčastěji se využívá dvou modelů. Prvním z nich je typ kapsule, též rezervoár. V tomto případě se okolo jádra částice vytvoří obalová vrstva a jádro je v ní bezpečně uzavřeno. Druhým typem je matrix. Jedná se o seskupení více jader, která jsou spolu uzavřena v obalovém materiálu.[27], [33]. Oba typy částic jsou graficky znázorněny na Obrázek 5.



Obrázek 5: Typ enkapsulovaných částic [33]

2.4.1 Obalové materiály

Jak již bylo zmíněno, obalový materiál je schopen jádro ochránit proti nepříznivým podmínkám a zabránit tak jejich znehodnocení. Volí se s ohledem na požadavky skladování, stabilitu i cenu. Jedná se především o materiál přírodního původu, schopné biodegradace, který dokáže tvořit dostatečnou ochranou vrstvu. Vůči látce samotné by měl být obal inertní, v použití pro potravinářský průmysl je žádoucí využití materiálu s označením GRAS, jenž je v obecnosti považován za bezpečný [27].

Jako obalový materiál se používají nejčastěji polysacharidy – škrob a jeho deriváty, dále pak rostlinné extrakty jako arabská guma, pektiny, karagenan a alginát. Použít lze i živočišné a mikrobiální polysacharidy jako dextran, chitosan, xanthan [28].

Dále je možné použít látky lipidického a proteinového charakteru jako jsou fosfolipidy, vosky, mastné kyseliny, proteiny mléka, gluten, želatina, laktoferrin, ovalbumin aj. [27].

2.4.1.1 Polysacharidové obalové materiály

Podstatné pro výběr polymeru je druh monomeru a jeho vazby, počet i sekvence. To vše ovlivňuje molekulovou hmotnost, náboj, reaktivitu polymeru a další vlastnosti. Náboj polysacharidu určuje jeho sacharidová část a prostředí. Mezi neutrální polysacharidy patří například škrob a celulóza, k záporně nabitým alginát, karagen a ke kladným chitosan [29].

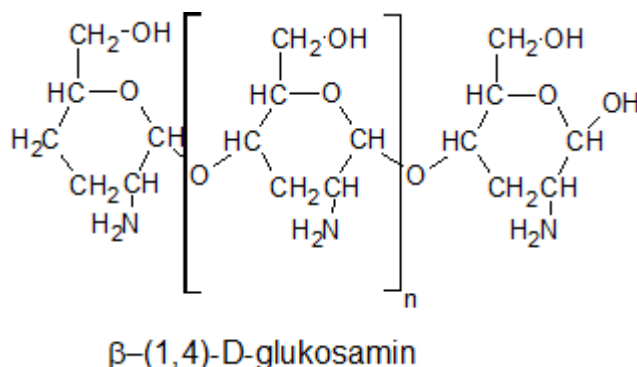
- Alginát

Alginát neboli sůl kyseliny alginové je látka původem z mořských řas rodu *Phaeophyceae*. Z chemického pohledu se jedná o nevětvěný lineární kopolymer kyseliny β -D-mannuronové a α -L-guluronové spojený β -(1 \rightarrow 4) glykosidickými vazbami, přičemž vzájemný poměr zastoupených kyselin rozhoduje o technologických vlastnostech polymeru. Komerční alginát se vyskytuje ve formě sodné soli, která je rozpustná. Převodem na vápenatou sůl získáme nerozpustnou sůl, čehož se využívá též při enkapsulaci, kdy se roztok alginátu sodného sráží roztokem chloridu vápenatého za vzniku stabilního gelu. Algináty mají v potravinářství své uplatnění jako emulgátory, stabilizátory a zahušťovadla [30].

- Chitosan

Chitosan je polysacharid složený z N-acetylglukosaminových a glukosaminových jednotek, spojených β -(1 \rightarrow 4) glykosidickými vazbami. Je rozpustný v alkalickém a neutrálním prostředí. Molekuly chitosanu jsou kladně nabitě molekuly, které v přítomnosti záporného náboje koagulují. Při enkapsulaci se této vlastnosti využívá při srážení s roztokem tripolyfosfátu sodného [31].

S kovy se chová komplexotvorně. Ve farmacii se využívá pro jeho schopnosti snižovat hladinu cholesterolu a tuků v játrech a krvi. V potravinářství se běžně používá jako emulgátor, stabilizátor, zahušťovadlo a želírující činidlo [30]. Chemický vzorec chitosanu je uveden na Obrázek 6.



Obrázek 6: chitosan

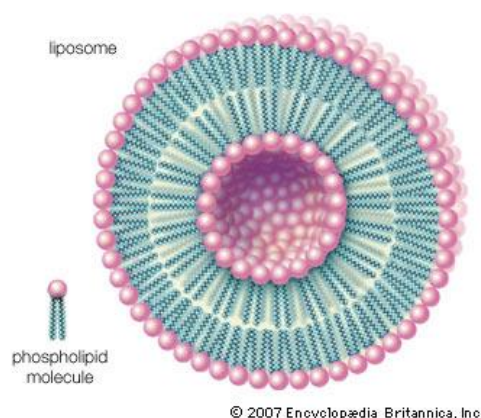
- Škrob

Škrob je zásobní polysacharid rostlin, který se nachází v nerozpustných granulích, které se liší s rostlinným druhem. Z chemické stránky je škrob polymerem lineární amylozy a větveného amylopektinu, přičemž glukózové jednotky amylozy jsou vázány α -(1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou, u amylopektinu se navíc vyskytuje vazba α -(1 \rightarrow 6), která se objevuje přibližně po 25 jednotkách a má za následek větvení polymeru. Dle uspořádání v granulích škrobu rozlišujeme oblast amorfni a krystalickou. V potravinářství se setkávám s formou škrobu nativní a modifikovanou. Používá se jako stabilizátor, želírovací prostředek, k bobtnání vody atd [30].

2.4.1.2 Lipidové obalové materiály

Mezi hojně používané nosiče sloučenin náleží lipozomy [32]. Útvary tvořené dvojvrstvou lipidické membrány s dutinou. Tyto útvary vznikají díky hydrofilně-hydrofobním interakcím mezi vodou a fosfolipidy [27], [33]. Díky své velikosti i složení se jedná o značně univerzální sloučeniny, které jsou schopny přenášet hydrofilní i hydrofobní látky [32].

Používají se zejména pro přenos živin, bioaktivních látek a léčivých látek. Hojně používané jsou tedy ve farmaceutickém průmyslu. V závislosti na velikosti lipidových částic jsou definovány jejich vlastnosti [34]. Struktura lipozomu je znázorněna na Obrázek 7.



Obrázek 7: struktura lipozomu

2.4.2 Metody enkapsulace

Enkapsulace můžeme probíhat různými způsoby, jedná se však většinou o stejný princip. Základem je vytvořit kapičky aktivní látky, které je potřeba obalit nosičem. Technika je zvolena na základě požadavků na funkčnost s ohledem na organoleptické vlastnosti potravin. Mezi nejpoužívanější techniky patří sprejové sušení a chlazení, lyofilizace, extruze, koacervace, inkluze, tvorba emulzí a lipozomů [35].

2.4.2.1 Sprejové sušení

Technika sprejového sušení je průmyslově nejrozšířenější metoda enkapsulace, kterou je kapalina přeměňována na prášek. Aktivní látku je nejdříve nutno rozpustit/dispergovat do roztoku obalového materiálu. Směs se poté atomizuje a suší v komoře, kde je odpařována voda pomocí horkého vzduchu [27]. Finálním produktem jsou částice o velikosti menší než 40 μm [36].

Negativem je, že technika je vhodná pouze pro termostabilní materiály rozpustné ve vodě, jako obalové materiály se používají modifikované škroby, maltodextrin a arabská guma [37].

2.4.2.2 Sprejové chlazení a mražení

Obě tyto metody jsou založené na sušení a na první pohled by se mohlo zdát, že jsou si nesmírně podobné. Totožné je pro obě metody vhánění studeného vzduchu do sušící komory [38].

Diference se objevuje u teploty bodu tání lipidů. Při sprejovém mražení se nachází v rozmezí 35–45 $^{\circ}\text{C}$, u chlazení je o něco vyšší [39]. Díky využití především lipidických obalových materiálů jsou

kapsule připravené těmito metodami ve vodě nerozpustné, a proto techniky nacházejí uplatnění při enkapsulaci enzymů, vitamínů, minerálů a jiných ve vodě rozpustných látek [38].

2.4.2.3 Lyofilizace

Při procesu lyofilizace se nejdříve nosič spolu s aktivní látkou rozpouští ve vodě a poté zmrazují, přičemž voda je odstraněna pomocí sublimace za sníženého tlaku [38].

Nevýhodou metody je vysoký nárok na energii a dobu přípravy. Lyofilizace se používá k enkapsulaci ve vodě rozpustných látek aromatického charakteru, esencí a termolabilních látek [27].

2.4.2.4 Extruze

Během extruze je emulze protlačována přes otvor/otvory trysek. Emulze je získána z taveniny mono a disacharidů a enkapsulovaného materiálu. Odkapávající částice jsou chlazeny prostředím a dehydratovány rozpouštědlem. Ztvrdnutím obalového materiálu po kontaktu s daným rozpouštědlem dochází k enkapsulaci aktivní látky. Typickým rozpouštědlem je isopropanol nebo tekutý dusík. Extruzí vznikají částice o velikosti do 2000 μm [40].

2.4.2.5 Koacervace

Principem koacervace je rozdělení dvou nemísitelných fází biopolymeru v roztoku. Jedna fáze pak obsahuje výrazně větší množství polymeru, což má za následek obalení aktivní látky a vznik koacervátu. Podle množství použitých polymerů rozlišujeme typ jednoduchý s 1 polymerem a komplexní s více polymery opačných nábojů. Při obou metodách dochází ke vzniku kapek, které sedimentují nebo koagulují a spoluvytváří oddělenou koacervovanou fázi. Nachází-li se v roztoku jádra, kapky se hromadí v jejich okolí a v reakci se síťovacím činidlem tvoří stěnu koacervátu [41].

Nevýhodou techniky je vysoká cena, uplatnění nachází při enkapsulaci vonných olejů, vitamínů, enzymu aj.

2.4.2.6 Inkluze

Základem inkluze je zachytávání aktivních látek do dutin vytvořených často cyklodextriny [35].

Vnitřní kapsa molekuly má průměr cca 0,5 nm, a proto lze enkapsulovat pouze málo látek vhodné velikosti. Používá se při enkapsulaci aromat a lipofilních vitamínů [41][42].

2.4.2.7 Emulgace

Pro enkapsulaci ve vodě rozpustných aktivních látek se uplatňuje též metoda emulzifikace. Rozlišujeme dva základní typy emulzí – voda v oleji, olej ve vodě. Voda v oleji je typ složitější, který se používá pro tvorbu stabilních kapslí [43].

Emulze často vznikají mechanicky, pomocí homogenizátorů, mixerů, míchadel apod. Stabilitu emulzí lze ovlivnit přidávkou stabilizátorů a emulgátorů, případně lze techniku také kombinovat se sušícími metodami. Nevýhodou metody je použití organických rozpouštědel, které mohou mít toxické účinky [44].

2.4.2.8 Tvorba lipozomů

Lipozomy jsou schopny zachytit látky hydrofilního i hydrofobního charakteru. Vzniklé částice mohou být velikosti až několika mikrometrů [33]. Lipozomy jsou vhodné pro látky ve vodě rozpustné. V potravinářství se uplatňují například při enkapsulaci enzymů [40].

2.5 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační technika využívající dělení složek směsi mezi dvě odlišné fáze na základě jejich afinity vůči dané fázi [45]. První fáze je nepohyblivá, zvaná stacionární, druhá – mobilní fáze je pohyblivá. Při chromatografii jsou molekuly složek opakovaně přenášeny do stacionární fáze a zpět. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dále jen HPLC, umožňuje separaci složitých směsí látek v krátkém čase. Mobilní fázi tvoří kapalina, stacionární fázi bývá sorbent, jež se nachází v koloně, sloupci, případně na ploše. Nejčastěji se využívá sorbentu naplněného v kolonách, kde se nachází v podobě částic o velikosti 3–10 μm . Pro toto uspořádání jsou vhodné větší průtoky mobilní fáze, což zajišťují vysokotlaká čerpadla [46].

Instrumentace HPLC bývá v uzavřeném systému, kde je zajištěn transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separace látek a jejich detekce [45]. Záznam, který je získán v připojeném počítači se nazývá chromatogram [46].

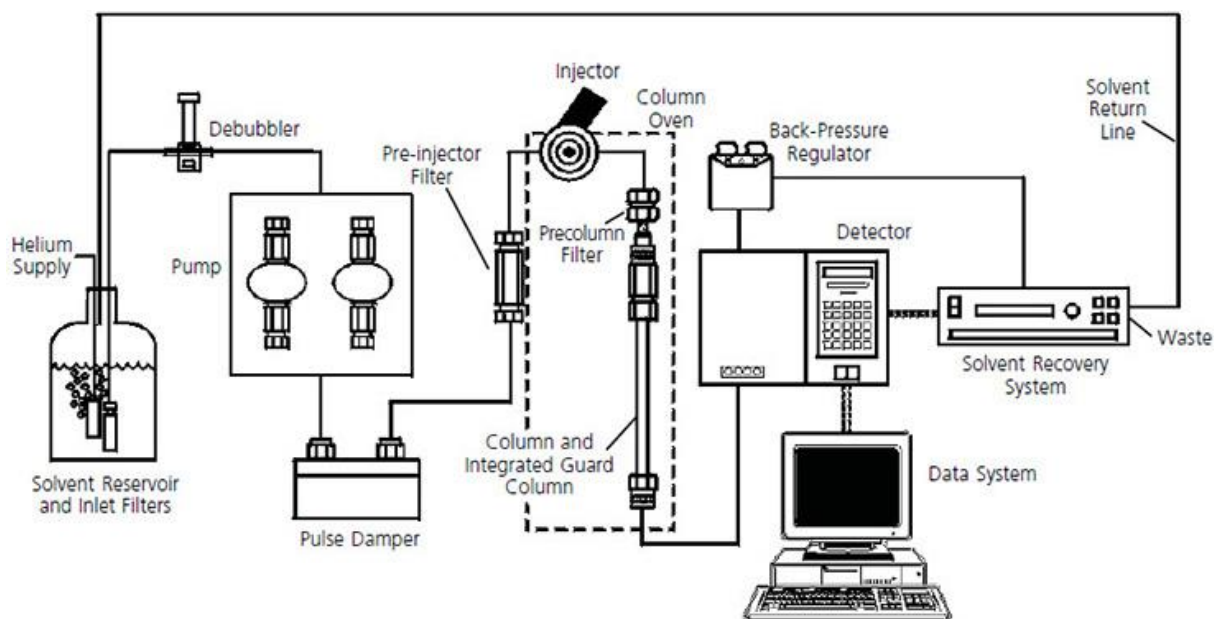
Dávkování mobilní fáze je zajištěno čerpadly, která musejí být odolná vůči korozi, nejčastěji z nerezové oceli, titanu nebo keramických materiálů. Je potřeba, aby čerpadla byla chemicky inertní, zajišťovala konstantní průtok, který lze vhodně regulovat a vydrželi tlak vyšší 10 MPa [46].

Vzorek se do mobilní fáze dávkuje pomocí dávkovacích systémů. Běžně se využívá dávkovacích kohoutů s dávkovacími smyčkami, které zajišťují odměření správného objemu vzorku. Dávkování může probíhat ručně i pomocí automatických dávkovačů [46].

Základem je však kolona, kde dochází k samotné separaci mezi fázemi. V současnosti kolona dosahuje délky v rozsahu 5–25 cm a vnitřního průměru až několik mikrometrů [45]. V některých přístrojích je možné nalézt též předkolonu, která chrání kolonu před nečistotami. Předkolona je vyplněna stejnou stacionární fází jako kolona. Kolona je vyrobena z inertního a odolného materiálu, má tvar trubice a je zkonstruována tak, aby vydržela působení vysokých tlaků [46].

Detekci látek zajišťuje detektor. Nejčastěji využívaný detektor pro HPLC je fotometrický UV/VIS detektor, měřící absorbanci eluátu, který opouští kolonu [46]. Specifičtější detektory jsou fluorescenční nebo elektrochemické detektory. Dále se využívají refraktometrické a fluorescenční detektory. [47].

Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na následujícím Obrázek 8.



Obrázek 8: Instrumentace HPLC [48]

2.6 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie, též GC, je analytická metoda, při které stejně jako u kapalinové chromatografie dochází k separaci látek mezi stacionární a mobilní fází. Hlavním rozdílem mezi těmito technikami je použitá mobilní fáze. Při GC se jako mobilní fáze využívá nosného plynu. Sloučeniny se v tomto případě v koloně separují při rostoucí teplotě. Při adsorpční chromatografii se vzorek v plynné podobě adsorbuje na povrch tuhého adsorbentu, jež tvoří výplň kolony. U rozdělovací chromatografie tvoří stacionární fázi vrstva netěkavé kapaliny na povrchu pevného nosiče [49].

Instrumentaci zařízení zajišťují zdroj nosného plynu, regulátor průtoku plynu, dávkovač, kolona, termostat, detektor a vyhodnocovací zařízení [50].

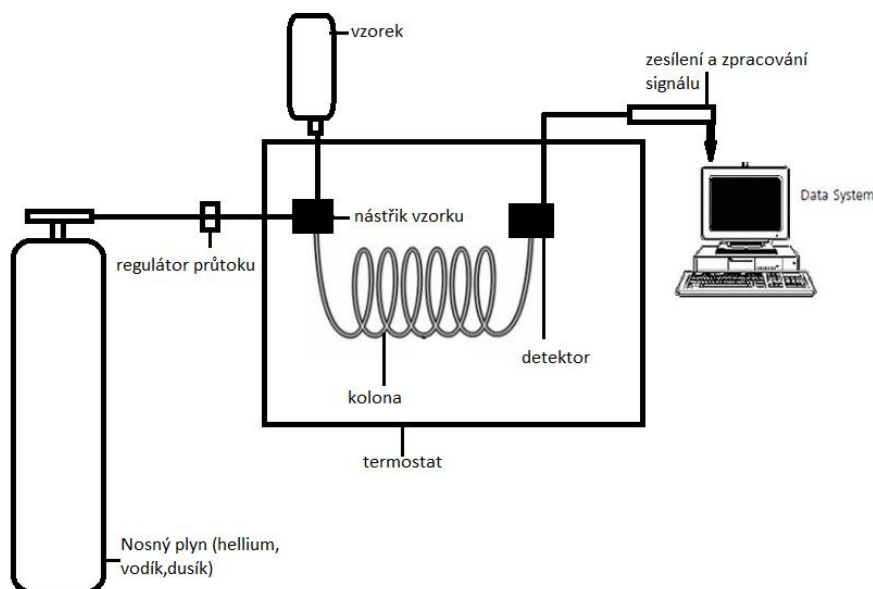
Zdrojem mobilní fáze jsou tlakové lahve permanentních plynů – dusíku, vodíku, argonu nebo helia, které jsou opatřeny ventily pro regulaci tlaku a průtoku. Nosný plyn proudí kolonou díky tlakovému spádu, kdy na počátku kolony je tlak vyšší a na konci už pouze atmosférický [46].

Dávkování zajišťuje injektor, který převádí analyt do plynného stavu a slouží k nástřiku na kolonu. Dávkovat lze vícero způsoby – přímo do kolony, s děličem toku, bez děliče toku, s programově zvyšovanou teplotou [50].

Kolony využívané v GC jsou kapilární a náplňové. Náplňové kolony jsou vyplněny sorbenty nebo nosiči s obsahem stacionární fáze. Do kapilární kolony lze stacionární fázi umístit různým způsobem, rozlišujeme tak separační kolonu se stacionární fází nanesenou na vnitřní straně kolony jako tenký film, kolonu vyplněnou na vnitřní stěně kolony pórovitou vrstvou smáčenou stacionární fází a kolony, ve kterých se nachází kapalná stacionární fáze vázaná na povrch pevného nosiče [50].

Detekce je uskutečňována celou řadou detektorů, k nejčastěji užívaným patří plamenový ionizační, tepelně vodivostní, hmotnostní spektrometr, atomový emisní detektor nebo detektor elektronového záchytu [46], [50].

Injektor, kolona i detektor je potřeba udržovat při konstantních teplotách. K tomuto účelu slouží termostat [46], [50]. Instrumentace metody je znázorněna na následujícím Obrázek 9.



Obrázek 9: Instrumentace plynového chromatografu

2.7 Screening trhu dětských doplňků stravy s obsahem řas a omega-3 mastných kyselin

Jako většina doplňků stravy se též přípravky obohacené o ω -3 mastné kyseliny rozšířily i do dětského sortimentu. ω -3 mastné kyseliny jsou člověku esenciální, ovlivňují činnost mozku i centrální nervové soustavy, mají vliv na zrak a stav srdce člověka. Klasickým doplňkem stravy s obsahem ω -3 mastných kyselin je rybí olej, který je prodáván jak v tekuté verzi, která je pro děti ochucená a aromatizovaná, tak ve verzi kapslí či želatinových bonbónů s ovocnou příchutí, jež jsou bez zápachu. Na trhu se však vyskytuje spousta dalších variant, především se jedná o preparáty typu pastilky a želatinové bonbóny vhodné pro děti od 3 let, nebo aromatizované sirupy s kombinací rybího a rostlinného oleje. Časté jsou též preparáty v kombinaci ω -3 a ω -6, nebo ω -3-6-9 mastných kyselin. Suplementace ω -3 mastných kyselin se pro zvýšení účinku doporučuje též v kombinaci s vitamíny skupiny B. Na trhu existují preparáty v kombinacích i s dalšími vitamíny jako vitamín C, E, A a D, které zároveň plní funkci antioxidantů a chrání ω -3 mastné kyseliny před oxidací. Suplementy často nabývají rozličných tvarů po vzoru cukrovinek, za účelem oslovit dětské spotřebitele svým vzhledem, k nalezení jsou tak rybičky či medvídci ovocných příchutí, nejčastěji citrón, pomeranč, jahoda, tutti-frutti apod. Příklad doplňku

stravy s omega-3 mastnými kyselinami ve tvaru rybiček uvádí Obrázek 10. Jedná se doplněk Omega-3 Gummies for Kids od společnosti Jamieson.



Obrázek 10: Omega-3 suplementy pro děti

Běžně se vyskytují také suplementy s obsahem řas, vhodné pro dětské spotřebitele. V prvním případě se jedná o práškové formy řas, rozpustné ve vodě, které jsou určeny k pití a jsou určeny pro konzumenty od 3 let. Typickým příkladem takového suplementu je *Chlorella vulgaris*, prodáváná jako dezintegrované buňky řasy, za účelem lepší stravitelnosti a vysoké vstřebatelnosti účinných látek. Ukázkový produkt je zobrazen na Obrázek 11. Dále je možné setkat se s multivitaminy pro děti, které mimo jiné obsahují výtažky z řasy spiruliny nebo i esenciální mastné kyseliny získané z mořských řas, jako je tomu u produktu multivitamin pro děti od Terranova health, který je znázorněn na Chlorella vulgaris – doplněk stravy

Obrázek 12: Multivitamin Terranova health



Obrázek 11: Chlorella vulgaris – doplněk stravy



Obrázek 12: Multivitamin Terranova health

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je vývoj a charakterizace doplňků stravy s obsahem řas a vybraných aktivních látek pro dětskou výživu.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Screening na trhu dostupných doplňků stravy pro dětskou výživu s obsahem řas a mastných kyselin
- 2) Příprava a charakterizace extraktů z řas a vybraných potravin
- 3) Enkapsulace připravených extraktů a zvolených aktivních látek
- 4) Návrh optimálního složení dětských doplňků stravy s obsahem řas a mastných kyselin

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, mikroorganismy a přístroje

4.1.1 Chemikálie

- Ethanol pro UV/VIS, Lach:Ner (ČR)
- Dusitan sodný, Lach:Ner (ČR)
- Chlorid hlinitý, Lach:Ner (ČR)
- Hydroxid sodný, Lach:Ner (ČR)
- Katechin, Sigma-Aldrich (D)
- Follin-Ciocalteu činidlo – p.a., Lach:Ner (ČR)
- Uhličitan sodný p.a., Lach:Ner (ČR)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (D)
- Peroxodisíran draselný, Lach:Ner (ČR)
- Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)
- ABTS, Sigma-Aldrich (SRN)
- Fenol p.a., Lach:Ner (ČR)
- Kyselina sírová 96 %, Lach:Ner (ČR)
- D-glukóza monohydrát p.a., Lach:Ner (ČR)
- n-Hexan pro HPLC – VWR (USA)
- Chloroform pro HPLC – LachNer (ČR)
- Kyselina šťavelová, LACHEMA Brno (ČR)
- Fenolftalein, LACHEMA Brno (ČR)
- Cholesterol, Sigma-Aldrich (D)
- Vaječný lecithin, Sigma-Aldrich (D)
- Nutrient broth medium, Himedia (IND)
- Methanol pro HPLC – Sigma (D)
- Aceton – LachNer (ČR)
- Alginát sodný, Sigma-Aldrich (USA)
- Agar powder, Himedia (IND)

4.1.2 Použité přístroje a pomůcky

- Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (D)
- Analytické váhy, Boeco (D)
- Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z36HK, Hermle (D)
- Vortex Reax Top, Hedolph (D)

- NanoPhotometer TM, Implen (D)
- Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)
- Soxhletův extraktor – Soxtherm, Gerhardt (D)
- Mineralizátor, Gerhardt (D)
- Plynový chromatograf, Thermo Scientific, Trace 1300 (ČR)
- HPLC/PDA sestava:
 - HPLC Thermo Fisher Scientific (USA)
 - Termostat – LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
 - Detektor PDA – PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
 - Pumpa – MS PUMP PLUS, Finnigan SURVEYOR
 - Vyhodnocovací software Xcalibur
 - Kolona Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm
- Držák předkolony Phenomenex – KJ0 – 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona – C18, AJ0 – 4287, Phenomenex
- Filtry pro HPLC, PRE-CUT, ALLtech (UK)
- Ultrazvuk – PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25 L, PowerSonic (SR)
- Ultrazvukový homogenizátor – Bandelin Sonoplus HS3200 – Sonorex Technik (D)
- Zetasizer Nano ZS, Malvern (UK)
- Elisa Reader BioTek ELx808, Biotek (D)
- Vakuová odparka RV 06, IKA (D)
- Box Aura mini Biotech (ČR)
- Lis na olej YODA 02, YODA (ČR)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

4.1.3 Použité mikroorganismy

V této práci byly použity kultury mikroorganismů pocházející z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně:

- *Micrococcus luteus* (CCM 1569)
- *Escherichia coli* (CCM 3954)
- *Staphylococcus epidermis* (CCM 4418)
- *Serratia marcescens* (CCM 8587)

4.2 Extrakce

Pro následující analýzy byly připraveny tři typy extraktů a macerátů. Jedná se o 30minutové vodné a ethanolové extrakty, 24hodinové vodné a ethanolové maceráty a hexanové extrakty. Příprava jednotlivých extraktů/macerátů je popsána v kapitolách 4.2.1 a 4.2.2.

4.2.1 Extrakce vodných a ethanolových vzorků

Pro přípravu 30minutových a 24hodinových extraktů byla použita navážka 1 g vzorku na 10 ml kapaliny. Ethanolové extrakty/maceráty byly připraveny v koncentracích 20%, 40%, 60%, 80% a 96% ethanol.

4.2.2 Extrahování olejů pomocí automatického přístroje Soxtherm

Extrakty z vybraných superpotravin byly extrahovány s použitím automatizovaného soxhletu pomocí hexanu po dobu 3,5 hodiny. Software ovládající extrakci byl nastaven podle parametrů uvedených v následující Tabulka 3. Extrakce hexanových extraktů pomocí přístroje soxtherm je znázorněna na Obrázku 13. Poté bylo zbývající rozpouštědlo odpařeno pomocí vakuové odparky. Vzorky byly umístěny do exikátoru, aby vytěkaly poslední zbytky rozpouštědla. Pro další spektrofotometické analýzy byly oleje rozpouštěny v koncentrovaném ethanolu po dobu.

Tabulka 3: Parametry softwaru přístroje Soxtherm

Parametr	Hodnota
T-classification	200 °C
Extraction temperature	170 °C
Reduction pulse	3 s
Reduction interval	3,5 min
Hot extraction	1,5 hod
Evaporation A	5x interval
Extraction time	1 hod
Evaporation B	2x interval
Evaporation C	10 min
Program lenght	3 hod, 4 min



Obrázek 13: Příprava hexanových extraktů

Hexanové extrakty byly dále použity pro analýzu flavonoidů, polyfenolů a antioxidační aktivity podle postupu uvedeném v kapitolách 4.3.1, 4.3.2 a 4.3.3. Také byly obdobně jako vodné a ethanolové maceráty použity pro tvorbu lipozomů a analýze profilu mastných kyselin, popsanych v následujících kapitolách 4.4 a 4.7.

4.3 Charakterizace extraktů

Extrakty a maceráty připravené podle postupu v kapitolách 4.2.1 a 4.2.2 byly použity k charakterizaci vzorků podle obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity. Postup jednotlivých analýz je uveden v následujících kapitolách 4.3.1, 4.3.2 a 4.3.3.

4.3.1 Stanovení celkových polyfenolů

Do zkumavek byl napipetován 1 ml 10x zředěného, předem připraveného Follin-Ciocalteuova činidla, 1 ml vody a 50 μ l vzorku. Roztok byl promíchán a ponechán při laboratorní teplotě po dobu 5 min. K roztoku byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na_2CO_3 .

Po opětovném promíchání byl roztok ponechán 15 min při laboratorní teplotě. Dále byla měřena absorbance roztoku při 750 nm. Kalibrační řada kyseliny gallové byla připravena v hodnotách 0,1–0,7 mg/ml.

4.3.2 Stanovení celkových flavonoidů

Pro stanovení celkových flavonoidů byly předem nachystány následující zásobní roztoky: 5% NaNO_2 , 10% AlCl_3 , 5% NaOH a roztok katechinu o koncentraci 1 mg/ml.

Při vlastním stanovení bylo do zkumavky napipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% NaNO_2 . Po 5 minutách při laboratorní teplotě byl k roztoku přidáno 0,2 ml 10% AlCl_3 . Po dalších 5 minutách bylo k roztoku přidáno 1,5 ml 5% NaOH a 1 ml vody. Po 15 minutách stání při laboratorní teplotě byla měřena absorbance pro vlnovou délku 510 nm. Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada katechinu rozpustného v 60% ethanolu v rozmezí 0,05–0,3 mg/ml.

4.3.3 Stanovení antioxidační aktivity

Rozpuštěním 0,096 g ABTS odpovídající $c=7$ mmol/l a 0,0166 g 2,45 mmol/l peroxodisíranu draselného v objemu 25 ml byl získán radikálový ion ABTS^+ , který byl ponechán ve tmě nejméně 12 hodin.

Připravený roztok ABTS^+ byl zředěn 96% ethanolem na hodnotu absorbance přibližně 0,700. Měření bylo prováděno při 734 nm proti ethanolu. Pro měření byla použita zúžená kyveta, přičemž 1 ml ABTS a 10 μ l vzorku bylo pipetováno přímo do kyvety. Byl zaznamenán pokles absorbance po 10 minutách, jako blank bylo použito 1 ml ABTS + 10 μ l destilované vody.

Zásobní roztok troloxu byl připraven o koncentraci 1 mg/ml a kalibrační řada byla následně sestavena v koncentračním rozmezí 40–400 μ l/ml.

4.4 Příprava a charakterizace lipozomů

Pro přípravu lipozomů bylo použito 10 mg cholesterolu, 90 mg sójového lecitinu, 1 ml extraktu a 10 ml destilované vody.

Lipozomy byly připravovány pomocí tyčového ultrazvuku při účinnosti 95 %, po dobu 1 min z vodných, ethanolových i hexanových extraktů.

4.4.1 Určení velikosti a stability připravených částic

U lipozomů byla stanovena jejich stabilita a velikost pomocí měření DLS. Stabilita částic byla vyhodnocena na základě porovnání hodnot zeta potenciálu s hraniční hodnotou –30 mV.

4.4.2 Stanovení enkapsulační účinnosti a dlouhodobé stability lipozomů

Po přípravě lipozomů byly vzorky zcentrifugovány při 11 000 ot/min po dobu 60 minut. Poté bylo v supernatantu stanoveno množství volných polyfenolů. Stejným způsobem byla stanovena koncentrace polyfenolů i v roztoku před enkapsulací. Z rozdílu koncentrace polyfenolů v roztoku před a po enkapsulaci byla následně stanovena enkapsulační účinnost.

Dlouhodobá stabilita byla stanovena po 12 týdnech opětovným stanovením obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity a kontrolou hodnot zeta potenciálů.

4.5 Stanovení celkového dusíku metodou dle Kjeldahla

Prvním krokem při stanovení celkového dusíku pomocí automatického kjeldahlova přístroje (viz Obrázek 14) je mineralizace. Do mineralizační trubice se odváží 1 g vzorku, 2 g weiningerova katalyzátoru a přidá se 10 ml koncentrované kyseliny sírové. Při mineralizaci vzniká čirý až bílý mineralizát, který je v případě ztuhnutí potřeba rozpustit v malém množství vody. K mineralizátu se přidá pár kapek fenolftaleinu a zahájí se automatická destilace, kdy objem 33% roztoku hydroxidu sodného je regulován přístrojem. Uvolněný amoniak je jímán do předlohy s 25 ml standardizovaného roztoku kyseliny sírové. Po skončení procesu se k destilátu přidá pár kapek Tashirova indikátoru a titruje se odměrným roztokem hydroxidu sodného do žlutého zbarvení. Pro stanovení vzorků byla zvolena metoda s názvem ZK 2 a následujícími parametry:

1. krok 15 min, 100 °C
2. krok 15 min, 200 °C
3. krok 120 min, 410 °C
4. krok 30 min, chlazení

Před vlastní analýzou je potřeba standardizovat roztoky hydroxidu sodného a kyseliny sírové. Odměrný roztok hydroxidu sodného se standardizuje titrací kyseliny šťavelové hydroxidem sodným na fenolftalein do růžového zbarvení. Kyselina sírová se standardizuje titrací odměrným roztokem hydroxidu sodného na tashirův indikátor do žlutého zbarvení.

Obsah celkového dusíku se vypočítá podle následující rovnice 1:

$$W_N = \frac{2 \cdot \left(c_{H_2SO_4} \cdot V_{H_2SO_4} - \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH}}{2} \right) \cdot M_N}{m_0} \quad (1)$$

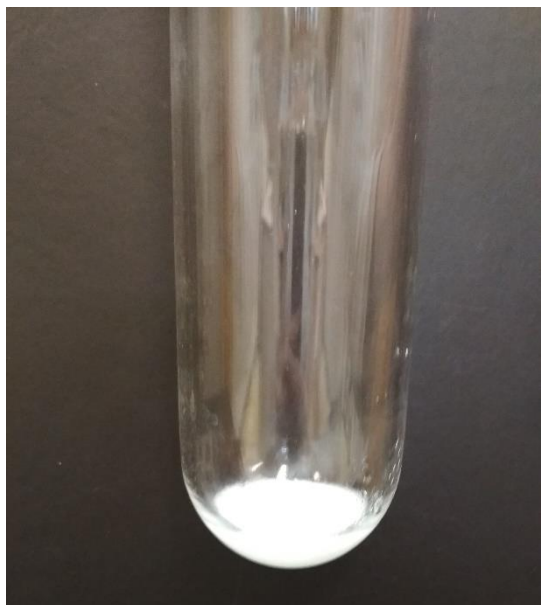
, kde W_N ... obsah dusíku, c (H_2SO_4) ... koncentrace kyseliny sírové, V (H_2SO_4) ... objem kyseliny sírové, c ($NaOH$) ... koncentrace hydroxidu sodného, V ($NaOH$) ... spotřeba hydroxidu sodného při titraci, M_N ... molární hmotnost kyseliny šťavelové, m_0 ... navážka vzorku



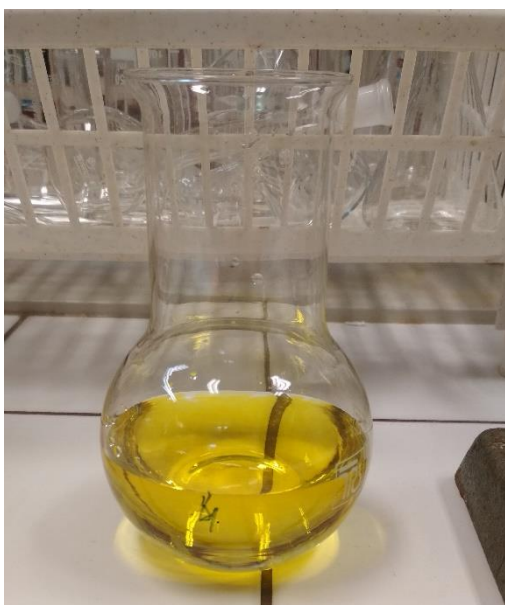
Obrázek 14: Přístroj pro automatizované stanovení Dusíku Kjeldahlovou metodou

Vzhled mineralizátu, který vzniká v prvním kroku analýzy, je možné vidět na Obrázek 15. V dalším kroku vzniká destilát, který je titrován na tashirův indikátor do žlutého zbarvení, jak je tomu i na Mineralizát před destilací

Obrázek 16: Výsledek analýzy po titraci.



Obrázek 15: Mineralizát před destilací



Obrázek 16: Výsledek analýzy po titraci

4.6 Stanovení celkových sacharidů podle Duboise

Pro stanovení byl připraven zásobní roztok 5% fenolu a roztok glukózy o koncentraci 1 mg/ml. K 1 ml vzorku byl přidán 1 ml 5% fenolu a 5 ml koncentrované H_2SO_4 . Vzorky byly ponechány 30 min při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena při vlnové délce 490 nm. Stanovení bylo kalibrováno pro glukózu v koncentračním rozmezí 0,02–0,1 mg/ml.

4.7 Určení profilu mastných kyselin pomocí plynové chromatografie

Pro stanovení obsahu mastných kyselin plynovou chromatografií byly použity vzorky dvojího typu. Pro první analýzu byla použita samotná biomasa. Vzorky biomasy byly použity k derivatizaci přeměněním

na methylestery mastných kyselin. Derivatizace probíhá 120 min při 85 °C po převedení 10 mg navážky biomasy spolu s 1,8 ml transesterifikační směsí do krymplovací vialky. Po skončení transesterifikace byl celý obsah krymplovací zkumavky převeden do větší 4ml vialky spolu s 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH a 1 ml hexanu. Směs se 3–5 min intenzivně protřepává na multipozičním vortexu. Po oddělení fází se z horní hexanové fáze odebere 0,1 ml do čisté vialky pro analýzu a přidá 0,9 ml hexanu. Takto připravený vzorek je bezbarvý a homogenní.

V případě použití extraktu pro analýzu pomocí plynové chromatografie byly oleje připravené na automatickém soxthermu převedeny do chloroformu na koncentraci 10 mg/ml. 1 ml vzorku se spolu s 0,8 ml transesterifikační směsí derivatizuje za stejných podmínek jako vzorky biomasy. Po transesterifikaci a vychladnutí krymplovacích zkumavek je celý jejich obsah opět převeden do větší 4ml zkumavky společně s 0,05 M NaOH. Vzniklé fázové rozhraní je 3–5 min protřepáváno na multipozičním vortexu. Ze spodní, chloroformové fáze je odebráno 0,1 ml vzorku a přidáno do čisté vialky s 0,9 ml chloroformu.

Vzorky proměřené plynovým chromatografem je nutno dále v softwaru přístroje zintegrovat a dále zpracovat. Pro analýzu byly použity parametry viz Tabulka 4.

Tabulka 4: Parametry instrumentální metody pro stanovení mastných kyselin

Front inlet	250 °C, split ratio 10, průtok 1 ml/min, nosný plyn – vodík
Kolona	zebron ZB-FAME, 30 m x 0,25 mm x 0,20 um
Detektor	260 °C, air flow 350 ml/min, makeup gas flow 30 ml/min, hydrogen flow 35 ml/min

4.8 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální testy byly provedeny v 96jamkové titrační destičce spektrofotometrickým stanovením.

K testování byly použity bakterie *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermis* a *Escherichia coli*. Mikroorganismy byly zaočkovány do média nutrient broth o objemu 50 ml, kde byly inkubovány po dobu 24 hod. Následně byly bakterie v objemu 1 ml přeočkovány do sterilního media o objemu 50 ml, čímž byly naředěny v poměru 1:50. Takto naředěné bakterie byly v objemu 150 µl napipetovány do titračních destiček spolu se 50 µl extraktu. Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení, tedy ihned a po 24 hodinách při 630 nm.

4.9 Stanovení obsahu karotenoidů a chlorofylů

Pro spektrofotometrické stanovení chlorofylů byly 2 g vzorku rozetřeny s 5 ml acetonu a vzniklá směs byla zfiltrována, převedena a doplněna do 25 ml v odměrné baňce. Roztoky byly 5x zředěny. Absorbance takto připravených vzorků byly proměřeny při vlnových délkách 663 nm a 645 nm proti acetonu. Koncentrace chlorofylů v mg/ml byly vypočítány podle následujících vztahů.

$$c_a = 12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} \quad (2)$$

$$c_b = 22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663} \quad (3)$$

$$c_a + c_b = 8,02 \cdot A_{663} + 20,20 \cdot A_{645} \quad (4)$$

* c_a = chlorofyl a, c_b = chlorofyl b, c_a+c_b = celkový obsah chlorofylu

Vzorky připravené pro stanovení chlorofylů byly použité též pro spektrofotometrické stanovení obsahu karotenoidů. Měření absorbance bylo provedeno při vlnové délce 445 nm. Koncentrace karotenoidů byly vypočteny z rovnice regrese $y = 0,056x - 0,0215$. Kalibrační řada o koncentracích 10, 5, 3, 2, 1 a 0,5 µg/ml byla připravena postupným ředěním zásobního roztoku standardu β-karotenu v acetonu.

4.10 Analýza obsahu pigmentů pomocí HPLC

Biomasa vzorků řas byla navážena s přesností na 4 desetinná místa a extrahována 15 minut v 0,5 ml destilované vody. Poté byly vzorky centrifugovány při 13 000 ot/min po dobu 5 minut. Následně byl extrakt oddělen od biomasy. K biomase byly přidány skleněné kuličky a 1 ml methanolu v kvalitě pro HPLC. Dále byly vzorky vortexovány 15 minut při 2 800 rpm a znovu centrifugovány při 13 000 ot./min, 5 minut. Supernatant s uvolněnými pigmenty byl zfiltrován přes nylonový filtr do vialky. Analýza pigmentů probíhala metodou HPLC s podmínkami separace uvedenými v Tabulka 5, složení mobilních fází je znázorněno v Tabulka 6.

Tabulka 5: Podmínky separace pigmentů na HPLC

Kolona	Kinetex, C18
Teplota	25 °C
Nástřík	15–60 µl
Eluce	0–13 min: lineárně ze 100 % A do 100% B, 13–19 min: 100% B, 19–20 min: lineárně ze 100% B do 100% A, 20–25 min: 100% A
Doba analýzy	25 minut

Tabulka 6: Složení mobilních fází

A	Složka	Acetonitril	Methanol	0,1M Tris-HCl (ph=8)
	Množství	840 ml	20 ml	140 ml
B	Složka	Methanol	Ethylacetát	/
	Množství	680 ml	320 ml	/

4.11 Příprava dětských doplňků stravy s obsahem řas a mastných kyselin

Na základě obsahu mastných kyselin ve vzorcích byly vybrány jejich vzájemné kombinace tak, aby výsledné doplňky stravy obsahovaly nutričně nejlepší možné zastoupení ω -3 a ω -6 mastných kyselin.

Pro potravinový doplněk určený dětem byl vybrán tvar medvídka. Základ každého medvídka tvořil 2% agar a 2% alginát v poměrech 1:1. Dále byly přidávány složky ovlivňující barvu, chuť a obsah mastných kyselin. Přidávky macerátů a aditivních látek jednotlivých medvídků byly řešeny individuálně s ohledem na chuť a konzistenci každého typu medvídka, výsledné složení medvídků uvádí *Tabulka 7*.

Tabulka 7: Složení částic pro senzorickou analýzu

Vzorek	Složení doplňku stravy
A01	Alginát + Agar + Zastudena lisovaný olej z konopného semínka s cukrem
B01	Alginát + Agar + Zastudena lisovaný olej z lněného semínka s cukrem v ½ medvídka, Alginát + Agar + biomasa řasy chlorelly ochucena sirupem s příchutí kiwi a cukrem ve druhé polovině medvídka
C01	Alginát + Agar + Zastudena lisovaný olej z vlašského ořechu, vanilkový cukr a macerát z řasy arame
D01	Alginát + Agar + Zastudena lisovaný olej z vlašského ořechu s cukrem v ½ medvídka, Alginát + Agar + macerát z řasy hijiki ochucený sirupem s příchutí malina a cukrem ve druhé polovině medvídka
E01	Alginát + Agar + macerát řasy spiruliny v kombinaci s jablečným sirupem a cukrem
F01	Alginát + Agar + macerát řasy wakame v kombinaci se sirupem s příchutí manga + cukr

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Diplomová práce je zaměřena na enkapsulaci bioaktivních látek obsažených ve vzorcích vybraných superpotravin. Zaměření práce je zejména na charakterizaci vzorků z nutričního hlediska a jejich použití k přípravě doplňků stravy.

5.1 Optimalizace a charakterizace vodných a ethanolových extraktů

5.1.1 Polyfenoly a flavonoidy

Optimalizace extraktce polyfenolů a flavonoidů byla prováděna na vybraných vzorcích řas. Extrakty pro optimalizaci a stanovení byly připraveny podle postupu v kapitole 4.2.1, postup stanovení obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity je popsán v kapitolách 4.3.1, 4.3.2 a 4.3.3. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Uvolnění polyfenolů ze vzorků do extraktů a macerátů bylo v prvním kroku porovnáno po týdnu. Pro tyto účely byly vybrány vodné, 20% ethanolové, 40% ethanolové a koncentrované 96% ethanolové preparáty. V případě vzorku chlorelly nejsou mezi extrakty a maceráty žádné výrazné rozdíly. V případě vzorku spiruliny bylo větší uvolnění polyfenolů zaznamenáno pouze u vodného macerátu, konkrétně se jedná o změnu koncentrace z hodnoty $2,35 \pm 0,04$ mg/g na $8,88 \pm 0,28$ mg/g. Naměřené hodnoty polyfenolů po týdnu macerace uvádí *Tabulka 8*. Jednotlivá zastoupení polyfenolů v koncentračních řadách obou vzorků znázorněných na *Obrázek 19* zobrazuje *Tabulka 9*.

Tabulka 8: 30min extrakty vybraných koncentrací při laboratorní teplotě a jejich porovnání po týdnu macerace

	Chlorella		Spirulina	
%	c [mg/g] po 30 min	c [mg/g] Po týdnu	c [mg/g] po 30 min	c [mg/g] Po týdnu
0 %	$1,19 \pm 0,00$	$2,02 \pm 0,02$	$2,35 \pm 0,04$	$8,89 \pm 0,28$
20 %	$1,33 \pm 0,01$	$1,50 \pm 0,00$	$6,10 \pm 0,13$	$7,25 \pm 0,12$
40 %	$1,48 \pm 0,00$	$1,34 \pm 0,01$	$1,91 \pm 0,03$	$1,89 \pm 0,01$
96 %	$1,80 \pm 0,00$	$1,90 \pm 0,03$	$1,32 \pm 0,06$	$1,67 \pm 0,09$

Tabulka 9: Porovnání polyfenolů u koncentrační řady extraktů řas po 30 min a 24 hod

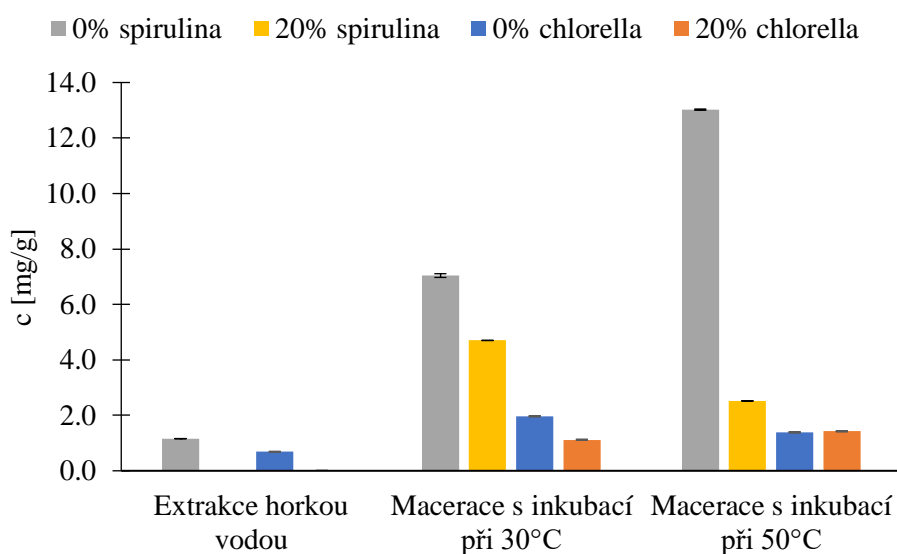
%	Chlorella		Spirulina	
	c [mg/g] po 30 min	c [mg/g] po 24 hod	c [mg/g] po 30 min	c [mg/g] po 24 hod
0 %	$1,28 \pm 0,01$	$2,72 \pm 0,00$	$5,53 \pm 0,02$	$8,21 \pm 0,00$
20 %	$1,29 \pm 0,00$	$1,01 \pm 0,00$	$1,32 \pm 0,02$	$5,23 \pm 0,00$
40 %	$1,37 \pm 0,01$	$1,32 \pm 0,01$	$1,34 \pm 0,06$	$2,28 \pm 0,02$
60 %	$1,42 \pm 0,00$	$1,29 \pm 0,00$	$1,69 \pm 0,08$	$1,28 \pm 0,00$
80 %	$1,99 \pm 0,01$	$2,35 \pm 0,01$	$1,89 \pm 0,04$	$1,76 \pm 0,00$
96 %	$1,34 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,00$	$1,17 \pm 0,09$	$2,28 \pm 0,00$

Nejvíce polyfenolů ve vzorku spiruliny bylo stanoveno ve vodném macerátu, $8,21 \pm 0,00$ mg/g a nejméně ve extraktu 96% ethanolu - $1,17 \pm 0,09$ mg/g. U vzorků chlorelly bylo nejvíce polyfenolů stanoveno opět ve vodném macerátu, konkrétně $2,72 \pm 0,00$ mg/g.

Další optimalizaci výběru extraktů/macerátů s ohledem na zastoupení polyfenolů ve vzorcích chlorelly a spiruliny popisuje Tabulka 10. Byly zde srovnány hodnoty získané při 30minutové extrakci s vroucí vodou, 24hodinovou macerací s inkubací při 30 °C a 24hodinovou macerací s inkubací při 50 °C. Pro potřeby této optimalizace byl využit jen vodný extrakt a extrakt do 20% ethanolu, jelikož oba tyto extrakty byly dle předchozí optimalizace vyhodnoceny jako nejvhodnější. U vodných extraktů vzorku chlorelly byl nejvyšší obsah polyfenolů zaznamenán při 24hodinové maceraci s inkubací při 30 °C, $1,96 \pm 0,00$ mg/g, a nejmenší při 30minutové extrakci s vroucí vodou. U extraktu do 20% ethanolu téhož vzorku byl obsah polyfenolů nejvyšší při 24hodinové maceraci s inkubací při 50 °C - $1,42 \pm 0,00$ mg/g. Nejvyšší obsah polyfenolů u vodných extraktů vzorku spiruliny byl též zaznamenán při 24hodinové maceraci s inkubací při 50 °C, $13,02 \pm 0,02$ mg/g, nejnižší při extrakci s vroucí vodou. Koncentrace polyfenolů u extrakce do 20% ethanolu byla u spiruliny nejvyšší po 24hodinové maceraci s inkubací při 30 °C, $4,70 \pm 0,00$ mg/g, a naopak nejnižší po maceraci s inkubací při 50 °C. Při optimalizaci výběru extraktů/macerátů s ohledem na koncentraci uvolněných polyfenolů vychází tedy nejlépe při použití vodného rozpouštědla 24hodinová macerace s inkubací při 50 °C. V případě 20% ethanolových macerátů pak 24hodinová macerace s inkubací při 30 °C. Nejnižší výsledky byly stanoveny při extrakci s vroucí vodou. Přehledně jsou dosažené výsledky optimalizace polyfenolů znázorněny v grafu na *Obrázek 17*.

Tabulka 10: Optimalizace výběru extraktu – polyfenoly

Optimalizace výběru vhodných extraktů či macerátů – výsledky koncentrace c [mg/g]				
Vzorek	Příprava	30 min extrakce s vroucí vodou	24hodinová macerace při 30 °C	24hodinová macerace při 50 °C
Chlorella	0 %	$0,68 \pm 0,01$	$1,96 \pm 0,00$	$1,39 \pm 0,00$
	20 %	/	$1,12 \pm 0,00$	$1,42 \pm 0,00$
Spirulina	0 %	$0,25 \pm 0,00$	$7,04 \pm 0,07$	$13,02 \pm 0,02$
	20%	/	$4,70 \pm 0,00$	$2,52 \pm 0,00$



Obrázek 17: Optimalizace polyfenolů – Chlorella a Spirulina

Dále byl při optimalizace extrakce, stejně jako v předchozím případě u polyfenolů, sledován obsah flavonoidů. Nejvyšší koncentrace flavonoidů ve vzorku spiruliny byla zaznamenána v 96% ethanolovém macerátu, $3,49 \pm 0,01$ mg/g, naopak nejnižší koncentrace flavonoidů byla u spiruliny zaznamenána v 80% ethanolovém extraktu $0,25 \pm 0,03$ mg/g. Nejvyšší koncentrace flavonoidů ve vzorku chlorelly byla stanovena v 80% ethanolovém macerátu, kde bylo naměřeno $3,91 \pm 0,01$ mg/g. Jednotlivá zastoupení flavonoidů v koncentračních řadách obou vzorků uvádí Tabulka 11.

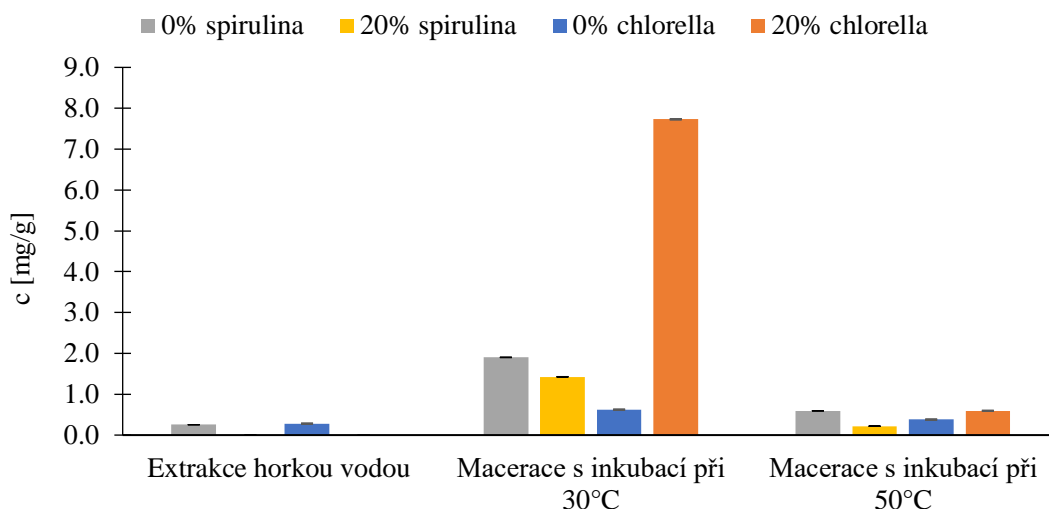
Tabulka 11: Porovnání flavonoidů u extraktů řas rodů Chlorella a Spirulina po 30 min a 24 hod, skladováno v chladu

%	Chlorella		Spirulina	
	c [mg/g] po 30 min	c [mg/g] po 24 hod	c [mg/g] po 30 min	c [mg/g] po 24 hod
0 %	0,37 ± 0,00	0,24 ± 0,00	1,20 ± 0,00	2,43 ± 0,00
20 %	0,35 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,37 ± 0,00	1,74 ± 0,01
40 %	0,90 ± 0,00	0,99 ± 0,00	0,28 ± 0,00	0,53 ± 0,00
60 %	2,09 ± 0,00	1,29 ± 0,00	1,04 ± 0,00	1,80 ± 0,02
80 %	2,62 ± 0,00	3,91 ± 0,01	0,25 ± 0,03	2,64 ± 0,01
96 %	2,44 ± 0,00	3,67 ± 0,02	2,34 ± 0,00	3,49 ± 0,01

Data ohledně koncentrace flavonoidů ve vzorcích chlorelly a spiruliny, která byla nashromážděna během optimalizace výběru extraktů/macerátů jsou uvedena v Tabulka 12. Opět byly srovnány hodnoty získané při 30minutové extrakci s vroucí vodou, 24hodinovou macerací s inkubací při 30 °C a 24hodinovou macerací s inkubací při 50 °C. Pro potřeby optimalizace byly využity pouze vodný preparát a 20% ethanolový preparát. Výsledky optimalizace jsou znázorněny na následujícím grafu viz Obrázek 18.

U vodných preparátů vzorku chlorella byl nejvyšší obsah flavonoidů zaznamenán při 24hodinové maceraci s inkubací při 30 °C, kde byla stanovena hodnota $0,62 \pm 0,00$ mg/g, a nejmenší při 30minutové extrakci s vroucí vodou. U 20% ethanolových preparátů téhož vzorku byl obsah flavonoidů opět nejvyšší při 24hodinové maceraci s inkubací při 30 °C $7,73 \pm 0,00$ mg/g. Nejvyšší obsah flavonoidů u vodných preparátů vzorku spiruliny byl též zaznamenán při 24hodinové maceraci s inkubací při 30 °C, $1,90 \pm 0,01$ mg/g, nejnižší při extrakci s vroucí vodou. Koncentrace flavonoidů 20% ethanolových vzorků byla u spiruliny opět nejvyšší po 24hodinové maceraci s inkubací při 30 °C, $1,42 \pm 0,00$ mg/g, nejnižší po maceraci s inkubací při 50 °C.

Z těchto výsledků jednoznačně vyplývá, že pro oba vzorky byly nejvyšší hodnoty flavonoidů stanoveny při 24hodinové maceraci s inkubací při 30 °C a nejnižší při extrakci s vroucí vodou, v případě 20% ethanolových macerátů pak při maceraci s inkubací při 50 °C, není tedy výhodné zpracovávat vzorky při vysoké teplotě, aby nedošlo ke ztrátě významných flavonoidů.

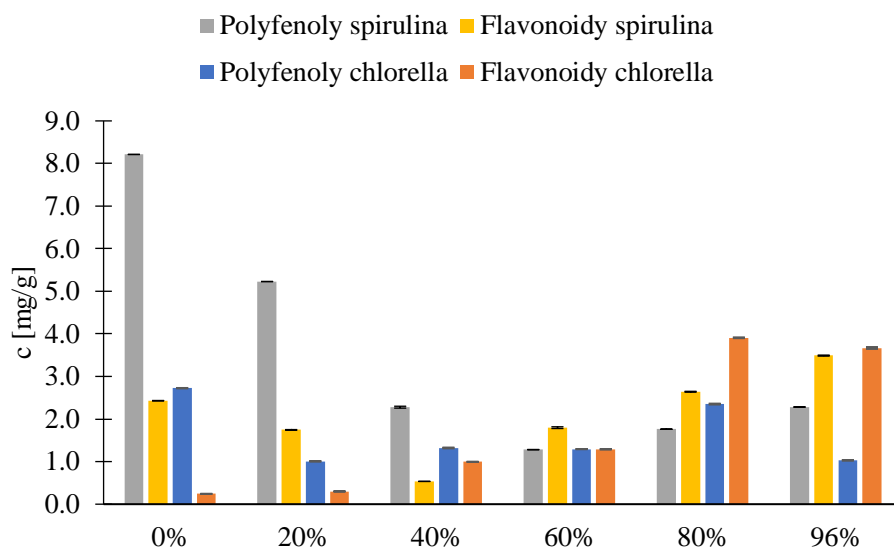


Obrázek 18: Optimalizace flavonoidů – Chlorella a Spirulina

Tabulka 12: Optimalizace výběru extraktu – flavonoidy

Optimalizace výběru vhodných extraktů či macerátů – výsledky koncentrace c [mg/g]				
Vzorek	Příprava	30 min extrakce s vroucí vodou	24hodinová macerace při 30 °C	24hodinová macerace při 50 °C
Chlorella	0 %	0,28 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,38 ± 0,00
	20 %	/	7,73 ± 0,00	0,59 ± 0,00
Spirulina	0 %	0,25 ± 0,00	1,90 ± 0,01	0,59 ± 0,00
	20%	/	1,42 ± 0,00	0,22 ± 0,00

Srovnání obsahu flavonoidů a polyfenolů v jednotlivých extraktech koncentrační řady pro vzorky chlorelly a spiruliny je znázorněno v následujícím grafu na *Obrázek 19*. Výsledné hodnoty obsahu polyfenolů a flavonoidů ve zvolených macerátech řas uvádí *Tabulka 13*, přičemž vzorky lněné semínko, konopné semínko a vlašský ořech byly analyzovány dodatečně na obsah polyfenolů. Nejvyšší koncentrace polyfenolů byla stanovena $11,61 \pm 0,00$ mg/g v ethanolovém macerátu vzorku arame, koncentrace flavonoidů byla nejvyšší v případě téhož vzorku, kde bylo stanoveno $8,96 \pm 0,46$ mg/g.



Obrázek 19: Optimalizace obsahu polyfenolů a flavonoidů

Tabulka 13: Výsledné hodnoty stanovení obsahu polyfenolů a flavonoidů

Vzorky	Polyfenoly c [mg/g]		Flavonoidy c [mg/g]	
	vodné	20% ethanol	Vodné	20% ethanol
Chlorella	2,72 ± 0,00	1,04 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,30 ± 0,00
Spirulina	5,53 ± 0,00	5,23 ± 0,00	2,43 ± 0,00	1,74 ± 0,01
Kombu	0,37 ± 0,00	0,25 ± 0,00	3,08 ± 1,00	0,93 ± 0,15
Arame	10,17 ± 0,00	11,61 ± 0,00	6,28 ± 0,03	8,96 ± 0,46
Wakame	0,57 ± 0,00	0,41 ± 0,00	3,81 ± 0,83	3,97 ± 0,10
Hijiki	2,67 ± 0,01	2,55 ± 0,00	2,94 ± 0,65	2,06 ± 0,43
Lněné semínko	2,27 ± 0,02	2,20 ± 0,00		
Konopné semínko	1,70 ± 0,00	1,65 ± 0,00		
Vlašský ořech	4,00 ± 0,00	6,17 ± 0,00		

5.1.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita vodných a ethanolových vzorků byla stanovena podle postupu v kapitole 5.4. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. V prvním kroku bylo i toto stanovení podrobeno optimalizaci výběru extraktu/macerátu. Opět byla sledována odezva u extraktů připravených 30minutovou extrakcí a macerátů připravených 24hodinovou macerací při 30 °C. Hodnoty získané při stanovení uvádí Tabulka 14.

Při stanovení antioxidační aktivity ve vzorku spiruliny byla nejvyšší koncentrace ve 30minutových extraktech stanovena v 80% ethanolovém extraktu, $13,70 \pm 0,00$ mg/g, nejnižší koncentrace ve 40% ethanolovém macerátu $1,18 \pm 0,00$ mg/g. Nejvyšší hodnoty pro 24hodinové maceráty byly nalezeny ve vodném macerátu, $22,96 \pm 0,00$ mg/g a nejméně v 96% ethanolu $1,15 \pm 0,01$ mg/g.

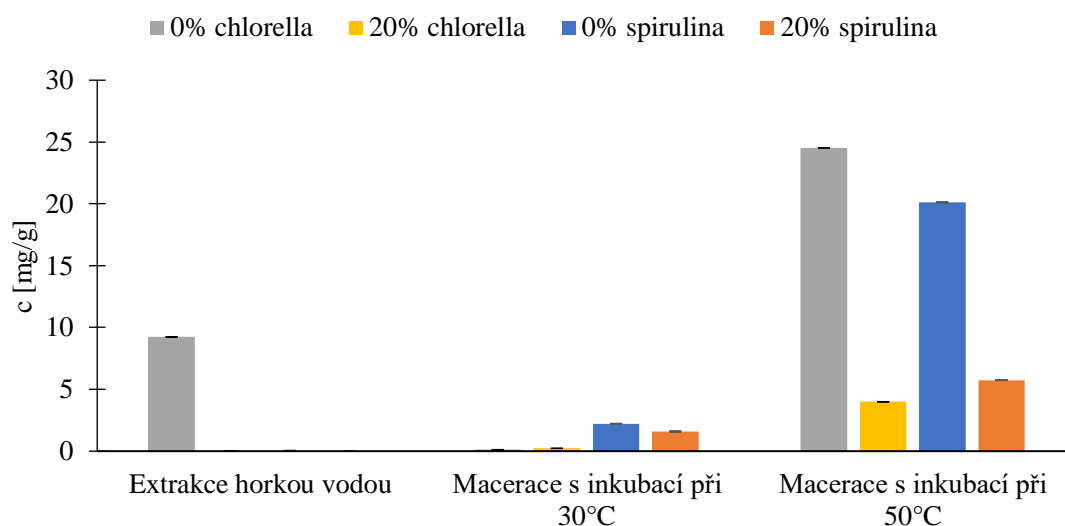
Tabulka 14: Porovnání koncentrační řady extraktů řas po 30 min a 24 hod

%	Chlorella		Spirulina	
	c [mg/g] po 30 min	c [mg/g] po 24 hod	c [mg/g] po 30 min	c [mg/g] po 24 hod
0 %	13,46 ± 0,01	6,56 ± 0,00	10,74 ± 0,00	22,96 ± 0,00
20 %	13,89 ± 0,01	6,29 ± 0,00	5,76 ± 0,00	15,75 ± 0,00
40 %	3,95 ± 0,00	0,12 ± 0,00	1,18 ± 0,00	1,18 ± 0,00
60 %	2,84 ± 0,00	0,24 ± 0,00	1,54 ± 0,00	1,32 ± 0,00
80 %	0,63 ± 0,00	0,09 ± 0,00	13,70 ± 0,00	2,90 ± 0,00
96 %	0,60 ± 0,01	1,27 ± 0,01	6,08 ± 0,01	1,15 ± 0,00

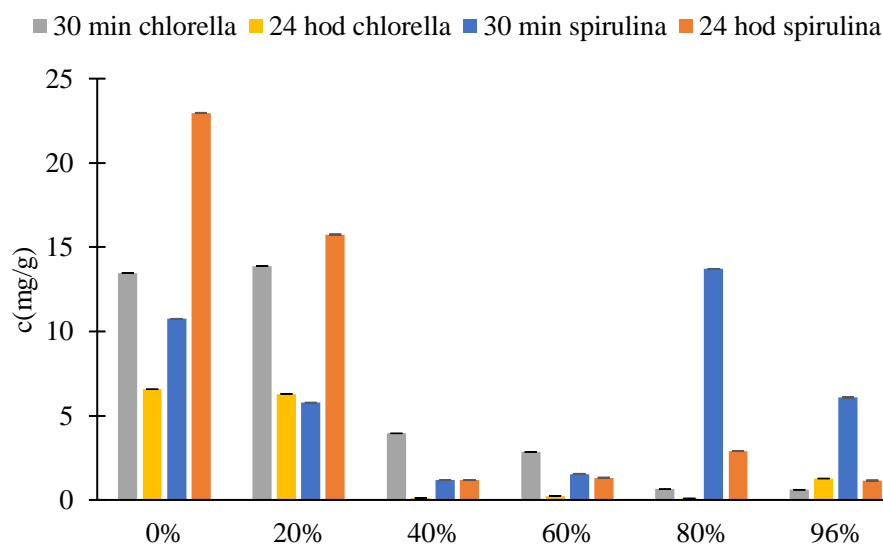
Hodnoty získané během optimalizace antioxidační aktivity ve vzorcích chlorelly a spiruliny popisuje Tabulka 15. Byly srovnány hodnoty získané při 30minutové extrakci s vroucí vodou, 24hodinovou macerací s inkubací při 30 °C a 24hodinovou macerací s inkubací při 50 °C. Též zde byl pro potřeby optimalizace využit jen vodný preparát a 20% ethanolový preparát. U vodných preparátů vzorku chlorelly byla nejvyšší hodnota antioxidační aktivity zaznamenána při 24hodinové maceraci s inkubací při 50 °C, 24,53 ± 0,01 mg/g, a nejmenší při maceraci s inkubací při 30 °C. U 20% ethanolových preparátů téhož vzorku byla antioxidační aktivity nejvyšší při 24hodinové maceraci s inkubací při 50 °C - 3,99 ± 0,00 mg/g. Nejvyšší zastoupení antioxidační aktivity u vodných preparátů vzorku spiruliny byl též zaznamenán při 24hodinové maceraci s inkubací při 50 °C, 20,12 ± 0,00 mg/g, nejnižší při extrakci s vroucí vodou. Koncentrace polyfenolů 20% ethanolových vzorků byla u spiruliny nejvyšší po 24hodinové maceraci s inkubací při 50 °C, 5,75 ± 0,00 mg/g, a nejnižší po maceraci s inkubací při 30 °C. Při optimalizaci výběru extraktů/macerátů s ohledem na množství antioxidační aktivity vychází nejlépe 24hodinová macerace s inkubací při 50 °C. Nejnižší výsledky byly stanoveny při extrakci s vroucí vodou, v případě 20% ethanolových macerátů pak při maceraci s inkubací při 30 °C. Výsledky optimalizace antioxidační aktivity jsou znázorněny v grafu na Obrázek 20.

Tabulka 15: Optimalizace antioxidační aktivity

Optimalizace výběru vhodných extraktů či macerátů – výsledky koncentrace c [mg/g]				
Vzorek	Příprava	30 min extrakce s vroucí vodou	24hodinová macerace při 30 °C	24hodinová macerace při 50 °C
Chlorella	0%	9,24 ± 0,00	0,12 ± 0,00	24,53 ± 0,01
	20%	/	0,23 ± 0,01	3,99 ± 0,00
Spirulina	0%	0,73 ± 0,05	2,21 ± 0,00	20,12 ± 0,00
	20%	/	1,59 ± 0,00	5,75 ± 0,00



Obrázek 20: Optimalizace antioxidační aktivity – Chlorella a Spirulina



Obrázek 21: Antioxidační aktivita vzorků Chlorella a Spirulina ve srovnání po 30 min a 24 hod

Obrázek 21 porovnává hodnoty antioxidační aktivity, které byla stanoveny ve 24hodinových macerátech a 30minutových extraktech vzorku chlorelly. Nejvyšší hodnota u 30minutových extraktů byla stanovena ve 20% ethanolovém macerátu, $13,89 \pm 0,01$ mg/g, poté ve vodném extraktu, a nejnižší koncentrace ve extraktu 96% ethanolu $0,60 \pm 0,01$ mg/g. Nejvyšší hodnota u 24hodinových macerátů byla stanovena ve vodném macerátu, $6,56 \pm 0,00$ mg/g a nejméně v 80% ethanolu - $0,09 \pm 0,00$ mg/g. Výsledné hodnoty antioxidační aktivity vybraných macerátů stanovené ve vzorcích řas uvádí Tabulka 16. Vzorky lněné semínko, konopné semínko a vlašský ořech byly stanoveny dodatečně. Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity náleží vodnému macerátu vzorku vlašský ořech, kde byla koncentrace stanovena $4,13 \pm 0,00$ mg/g.

Vzhledem k obsahu aktivních látek, prokázaných ve vodném 24hodinovém macerátu a 20% ethanolovém macerátu byly tyto extrakty dále využívány během následujících analýz.

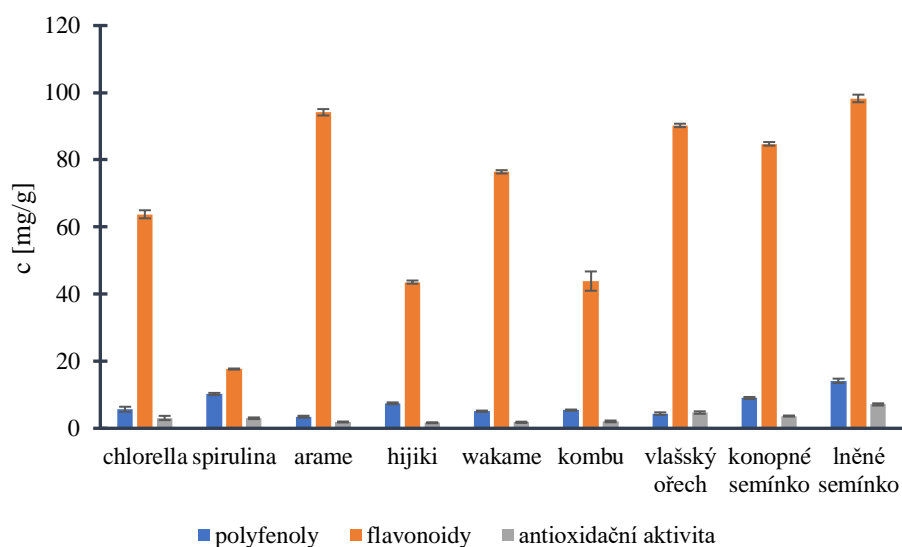
Tabulka 16: Výsledné hodnoty antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita c [mg/g]		
Vzorky	Vodné	20% ethanol
Chlorella	0,66 ± 0,00	0,63 ± 0,00
Spirulina	1,07 ± 0,00	0,58 ± 0,00
Kombu	0,84 ± 0,04	2,00 ± 0,00
Arame	2,65 ± 0,00	1,48 ± 0,00
Wakame	1,98 ± 0,00	1,74 ± 0,01
Hijiki	0,73 ± 0,04	2,65 ± 0,01
Lněné semínko	0,61 ± 0,00	0,61 ± 0,01
Konopné semínko	0,61 ± 0,00	1,19 ± 0,00
Vlašský ořech	4,13 ± 0,00	3,15 ± 0,19

5.2 Charakterizace lipidových extraktů

Lipidové extrakty byly připraveny pomocí přístroje Soxtherm podle postupu popsáném v kapitole 4.2.2. Po úpravě byly získané lipidové extrakty podrobeny analýze obsahu polyfenolů, flaonoidů a antioxidační aktivity podle postupu z kapitol 4.3.1–4.3.3. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v Tabulka 17 a vyobrazeny na Obrázek 22.

Nejvyšší koncentrace flavonoidů byla v tomto případě stanovena u vzorku lněného semínka, konkrétně $98,28 \pm 1,13$ mg/g. Dále pak ve vzorku arame $94,15 \pm 0,96$ mg/g a vlašského ořechu $90,24 \pm 0,51$ mg/g. Nejnižší koncentrace byla stanovena ve vzorku spiruliny $17,66 \pm 0,16$ mg/g. Stanovení obsahu polyfenolů prokázalo nejvyšší obsah ve vzorku lněného semínka $14,15 \pm 0,65$ mg/g a nejnižší u arame $3,45 \pm 0,29$ mg/g. Rovněž nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena u extraktů z lněného semínka.



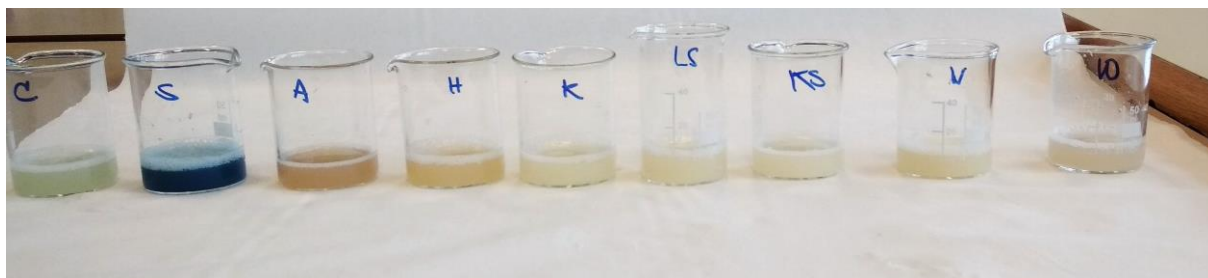
Obrázek 22: Celková charakteristika lipidových extraktů

Tabulka 17: Charakteristiky lipidových extraktů

Vzorek	c [mg/g]		
	Polyfenoly	Flavonoidy	Antioxidační aktivita
Chlorella	5,67 ± 0,74	63,76 ± 1,02	3,08 ± 0,63
Spirulina	10,21 ± 0,33	17,66 ± 0,16	2,30 ± 0,25
Arame	3,45 ± 0,29	94,15 ± 0,96	1,88 ± 0,14
Hijiki	7,45 ± 0,27	43,56 ± 0,48	1,65 ± 0,15
Wakame	5,08 ± 0,20	76,41 ± 0,50	1,78 ± 0,19
Kombu	5,42 ± 0,18	43,86 ± 2,87	2,05 ± 0,27
Vlašský ořech	4,37 ± 0,38	90,24 ± 0,51	4,69 ± 0,36
Konopné semínko	9,03 ± 0,30	84,75 ± 0,53	3,66 ± 0,16
Lněné semínko	14,15 ± 0,65	98,28 ± 1,13	7,12 ± 0,32

5.3 Příprava a charakterizace lipozomů

Podle postupu v kapitole 4.4 byly ze všech vzorků připraveny lipozomy, využito bylo 24hodinových vodných macerátů, 24hodinových macerátů do 20% ethanolu a lipidových extraktů. V následujících kapitolách je popsána příprava lipozomů, jejich velikost, stabilita a enkapsulační účinnost jednotlivých typů připravených lipozomů. Vzhled vodných lipozomů zobrazuje Obrázek 23.



Obrázek 23: Lipozomy vodných extraktů

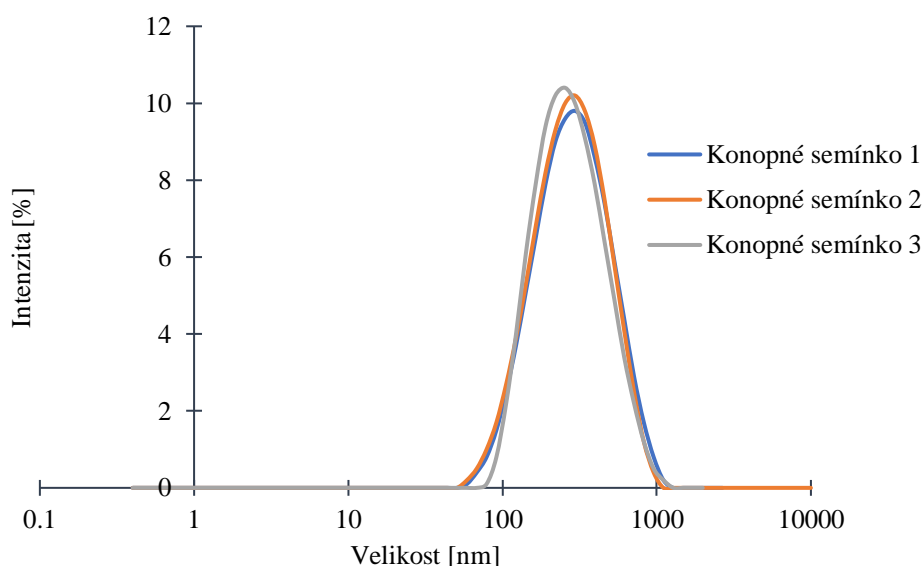
5.3.1 Určení velikosti a stability lipozomů

Všechny připravené lipozomové částice byly podrobeny analýze velikosti měřením DLS a stability změřením zeta potenciálu podle postupu z kapitoly 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr.

Průměrná velikost lipozomů se pohybovala v rozmezí 202,93–367,5 nm u lipozomů z vodných extraktů, 226,27–426,73 nm u lipozomů z ethanolových extraktů a 210,63–305,00 nm v případě lipozomů s obsahem lipidových extraktů. Jednotlivé hodnoty velikostí a polydisperzity uvádí Tabulka 18. Pro představu je velikost lipozomů z vodného extraktu konopného semínka prezentována i graficky na Obrázek 24. Ostatní grafy jsou k nalezení v příloze 1.

Tabulka 18: Velikost lipozomů

Lipozom	Velikost [nm]			PDI [/]		
	Vodné	Ethanolové	Lipidové	Vodné	Ethanolové	Lipidové
Chlorella	367,50	265,57	280,50	0,36	0,32	0,33
Spirulina	356,83	310,90	305,00	0,36	0,41	0,36
Arame	345,60	301,13	216,50	0,40	0,34	0,28
Hijiki	275,07	269,67	227,60	0,34	0,30	0,26
Wakame	344,70	269,03	229,25	0,39	0,33	0,29
Kombu	345,27	255,40	286,60	0,39	0,35	0,32
Lněné semínko	202,93	426,73	237,17	0,26	0,37	0,26
Konopné semínko	247,57	289,23	248,10	0,25	0,38	0,33
Vlašský ořech	295,93	226,27	210,63	0,36	0,23	0,24



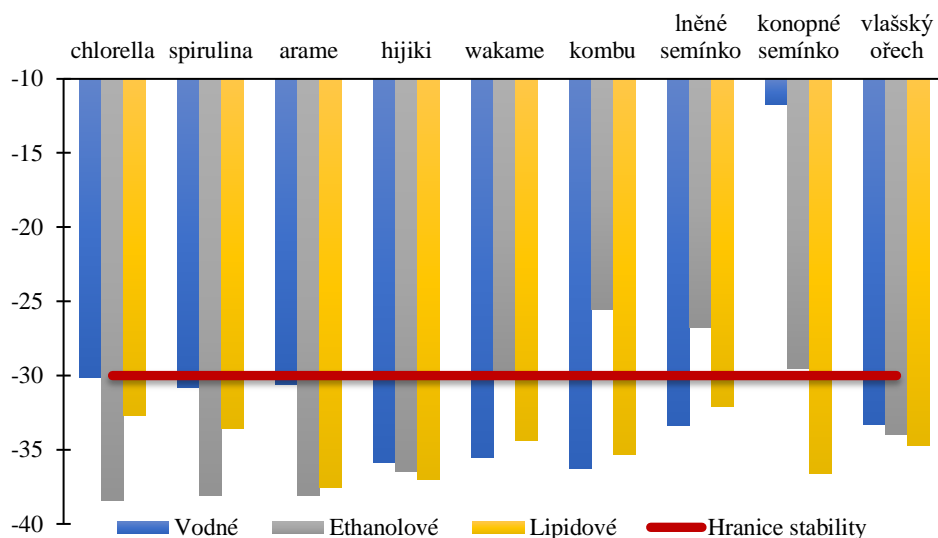
Obrázek 24: Příklad velikosti lipozomů z vodného extraktu – Konopné semínko

Na základě získaných hodnot zeta potenciálu je možno soudit, že všechny lipozomy s obsahem lipidových extraktů jsou stabilní, jelikož u žádného z nich nebyla získána absolutní hodnota zeta potenciálu nižší, nežli absolutní hodnota hraniční hodnota $-30,00$ mV.

Méně stabilní byly lipozomy wakame, kombu, lněného semínka a konopného semínka připravené z ethanolových extraktů. Nejméně stabilní byly lipozomy připravené z vodného extraktů konopného semínka, zde absolutní hodnota zeta potenciálu poklesla až na hodnotu $11,70$ mV. Tyto částice tak již mohou vykazovat například vyšší stupeň agregace. Získaná data jsou přehledně graficky znázorněna na Obrázek 25.

Tabulka 19: Určení stability lipozomů

Zeta potenciál [mV]			
Lipozomy	Vodné	Ethanolové	Lipidové
Chlorella	-30,13	-38,43	-32,67
Spirulina	-30,80	-38,10	-33,60
Arame	-30,60	-38,10	-37,53
Hijiki	-35,83	-36,47	-37,00
Wakame	-35,53	-29,63	-34,40
Kombu	-36,23	-25,57	-35,33
Lněné semínko	-33,33	-26,73	-32,07
Konopné semínko	-11,70	-29,53	-36,63
Vlašský ořech	-33,30	-34,00	-34,70



Obrázek 25: Grafické znázornění stability lipozomů

5.3.2 Charakterizace a enkapsulační účinnost lipozomů

Stanovení enkapsulační účinnosti u lipozomů bylo provedeno stanovením koncentrace polyfenolů podle postupu z kapitoly 4.4.2. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Dále byly lipozomy podrobeny analýze stanovení jejich antioxidační aktivity. Ze získaných hodnot (viz Tabulka 20) byla stanovena enkapsulační účinnost daných lipozomů.

U lipozomů připravených z vodných extraktů byla nejvyšší enkapsulační účinnost stanovena v případě vzorku chlorelly (99,77 %) a vlašského ořechu (98,64 %), nejnižší enkapsulační účinnost byla zaznamenána u vzorku wakame 80,81 %. U lipozomů připravených z ethanolových extraktů byla nejvyšší enkapsulační účinnost stanovena u vzorku spiruliny 99,68 % a hijiki 99,88 %, naopak nejnižší enkapsulační účinnost byla stanovena u vzorku wakame 63,87 %. V případě lipozomů s obsahem

lipidických extraktů pak bylo enkapsulováno nejvíce látek ve vzorku hijiki, konkrétně 89,96 %, nejméně pak ve vzorku vlašského ořechu, kde bylo enkapsulováno 52,59 % polyfenolů. Obecně lze tedy říci, že se podařilo do všech lipozomů enkapsulovat aktivní láky s účinností nad 52%, ve většině případů však enkapsulační účinnost neklesla pod 80 %.

Charakteristiky lipozomů získané při analýze jejich antioxidační aktivity jsou znázorněny v Tabulka 21 a následně v porovnání i s dlouhodobou stabilitou na Obrázek 26, Obrázek 27 a Obrázek 28.

U lipozomů připravených z vodných extraktů a lipozomů z ethanolových extraktů se hodnoty antioxidační aktivity podobají, koncentrace antioxidační aktivity u lipozomů z lipidových extraktů nabývají nepatrně nižších hodnot.

Tabulka 20: Enkapsulační účinnost polyfenolů

Enkapsulační účinnost polyfenolu [%]			
Vzorky	Vodné extrakty	Extrakty do 20% ethanolu	Lipidové extrakty
Chlorella	99,77	93,17	74,88
Spirulina	82,27	99,68	85,29
Arame	90,66	94,95	56,00
Hijiki	95,77	99,88	89,96
Kombu	81,82	70,45	76,83
Wakame	80,81	63,87	82,48
Lněné semínko	97,15	96,00	79,74
Konopné semínko	91,28	96,83	80,95
Vlašský ořech	98,64	97,42	52,59

Tabulka 21: Antioxidační aktivita lipozomů

Antioxidační aktivita - c [mg/ml]			
Vzorky	Vodné extrakty	Extrakty do 20% ethanolu	Lipidové extrakty
Chlorella	0,61 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,55 ± 0,00
Spirulina	0,61 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,55 ± 0,00
Arame	0,62 ± 0,00	0,65 ± 0,00	0,55 ± 0,01
Hijiki	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,00	0,50 ± 0,00
Kombu	0,62 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,48 ± 0,01
Wakame	0,61 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,53 ± 0,00
Lněné semínko	0,61 ± 0,00	0,62 ± 0,01	0,60 ± 0,01
Konopné semínko	0,61 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,59 ± 0,01
Vlašský ořech	0,61 ± 0,00	0,66 ± 0,04	0,59 ± 0,01

5.3.3 Dlouhodobá stabilita lipozomů

Všechny typy lipozomů byly uchovány v mrazu po dobu 3 měsíců. Po uplynutí této doby byla proměřena jejich stabilita. Stabilita byla ověřena kontrolou antioxidační aktivity lipozomů, stanovením množství uvolněných polyfenolů a rovněž analýzou zeta potenciálů. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Hodnoty zeta potenciálu zobrazuje *Tabulka 22*. Z dosažených výsledků lze po kontrole antioxidační aktivity konstatovat, že po 3 měsících byla u všech lipozomů její aktivita zachována. Množství uvolněných lipozomů se nachází v *Tabulka 23*.

Tabulka 22: Analýza dlouhodobé stability pomocí zeta potenciálu

Zeta potenciál [mV]			
Lipozomy	Vodné	Ethanolové	Lipidové
Chlorella	-49,47	-45,53	-48,93
Spirulina	-43,63	-45,30	-47,95
Arame	-43,10	-53,45	-55,00
Hijiki	-48,93	-54,05	-45,80
Kombu	-52,73	-52,00	-49,53
Wakame	-48,33	-48,00	-45,50
Lněné semínko	-62,67	-50,13	-44,70
Konopné semínko	-62,57	-50,67	-36,07
Vlašský ořech	-42,05	-50,10	-35,67

Koncentrace polyfenolů v supernatantu u větší poloviny lipozomů připravených z vodných extraktů vzrostla, u těchto vzorků již došlo pravděpodobně k rozpadu lipozomů a nastalo uvolňování aktivních látek. Nejvyšší koncentrace polyfenolů byla stanovena $0,06 \pm 0,01$ mg/ml ve vzorku vlašského ořechu. V případě poklesu koncentrace polyfenolů docházelo pravděpodobně k degradaci volných polyfenolů, možnost případného souběžného uvolňování aktivních látek však nelze zcela vyloučit.

U většiny lipozomů připravených z ethanolových extraktů koncentrace polyfenolů v supernatantu klesla, částice byly pravděpodobně stabilní a doba skladování 3 měsíce není pro tyto vzorky vhodná.

Koncentrace polyfenolů v supernatantu u všech lipozomů s obsahem lipidových extraktů vzrostla, tudíž již nastalo uvolňování polyfenolů z lipozomů a částice již nebyly 100% stabilní. Nejvyšší koncentrace polyfenolů v lipozomech z lipidových extraktů byla stanovena ve vzorku vlašský ořech $0,06 \pm 0,00$ mg/ml.

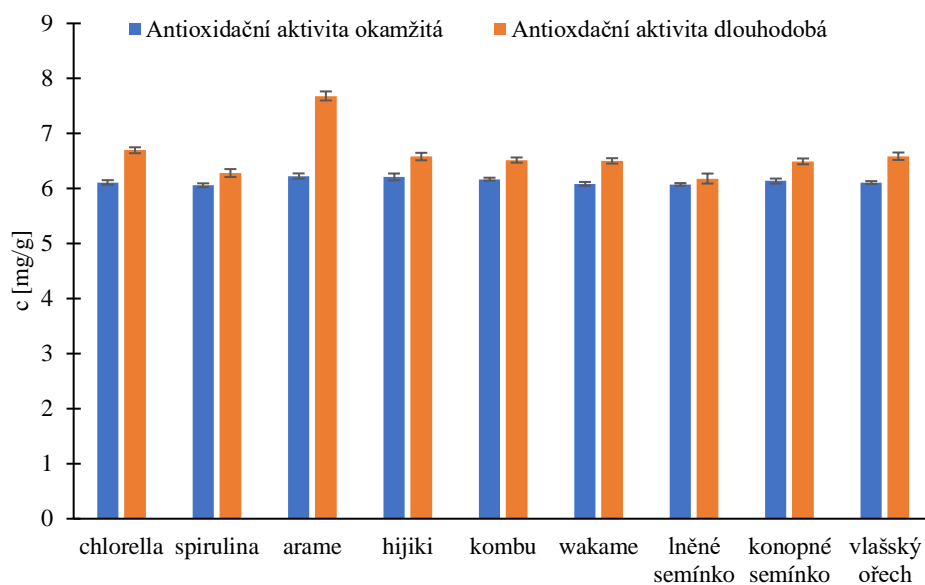
Tabulka 23: Dlouhodobá stabilita částic

POLYFENOLY – c [mg/ml]			
Vzorek	Vodné extrakty	Extrakty do 20% ethanolu	Lipidové extrakty
Hijiki	$-0,02 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
Arame	$0,02 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,01$
Kombu	$-0,02 \pm 0,00$	$-0,03 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
Wakame	$0,01 \pm 0,00$	$-0,01 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
Chlorella	$0,00 \pm 0,00$	$-0,01 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$
Spirulina	$0,10 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$
Vlašský ořech	$0,06 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$
Konopné semínko	$0,05 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,00$
Lněné semínko	$0,05 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$

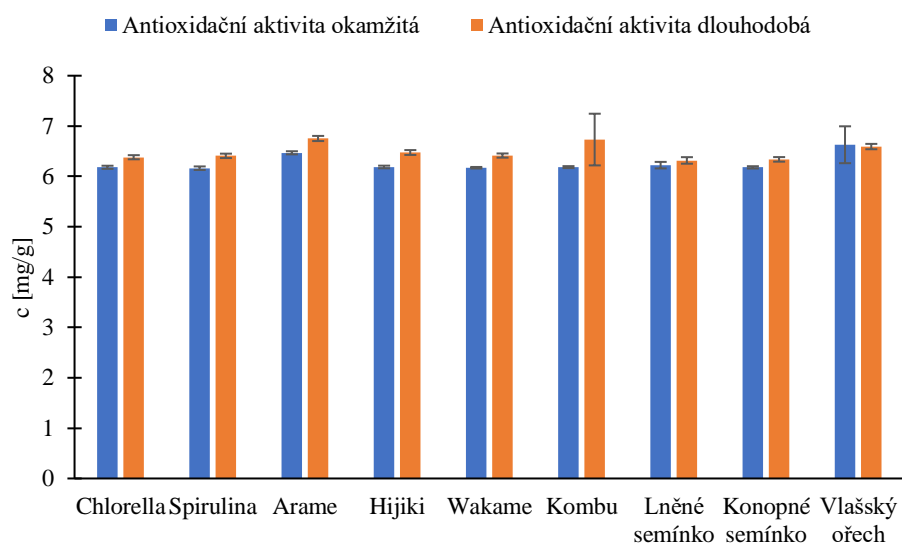
Tabulka 24: Antioxidační aktivita lipozomů po 12 týdnech

ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA – c [mg/ml]			
Vzorek	Vodné extrakty	Extrakty do 20% ethanolu	Lipidové extrakty
Hijiki	$0,66 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,00$	$0,64 \pm 0,59$
Arame	$0,77 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,59$
Kombu	$0,65 \pm 0,00$	$0,67 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,58$
Wakame	$0,65 \pm 0,00$	$0,64 \pm 0,00$	$0,65 \pm 0,59$
Chlorella	$0,67 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,00$	$0,65 \pm 0,59$
Spirulina	$0,63 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,00$	$0,66 \pm 0,60$
Vlašský ořech	$0,66 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,59$
Konopné semínko	$0,65 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,00$	$0,64 \pm 0,58$
Lněné semínko	$0,62 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,59$

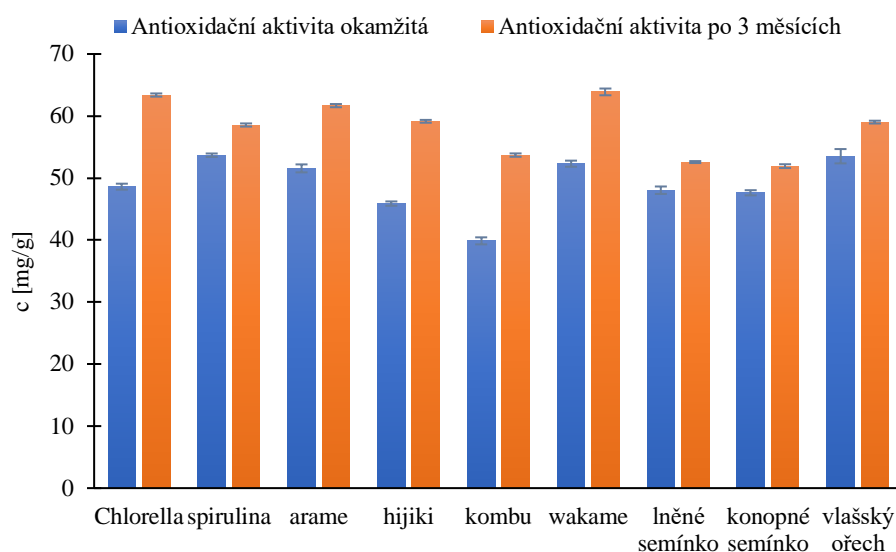
Výsledné hodnoty antioxidační aktivity lipozomů po 12 týdnech skladování uvádí Tabulka 24. Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity byla stanovena u lipozomů z vodného extraktu řasy arame, kde byla naměřena hodnota $0,77 \pm 0,01$ mg/ml, naopak nejnižší koncentrace byla stanovena $0,62 \pm 0,01$ mg/ml v lipozomech z vodného macerátu vzorku lněného semínka.



Obrázek 26: Antioxidační aktivita vodných lipozomů ihned a po 3 měsících



Obrázek 27: Antioxidační aktivita lipozomů z extraktů do 20% ethanolu v čase 0 a po 3 měsících



Obrázek 28: Srovnání antioxidační aktivity lipidových lipozomů před a po 3 měsících

Při kontrole stability částic pomocí měření zeta potenciálu byly všechny lipozomy uznány za stabilní, nicméně koncentrace polyfenolů v supernatantu u značné části vzorků vzrostla, u těchto vzorků již tedy nastalo uvolňování aktivních látek z lipozomů. Doba skladování 12 týdnů tedy není pro tyto vzorky vhodná. Pro prodloužení trvanlivosti by bylo možné použít například lyofilizaci.

5.4 Stanovení obsahu bílkovin pomocí Kjeldahlovi metody

Stanovení obsahu bílkovin je první kapitolou, která informuje o základním nutričním složení studovaných superpotravin. Analýza proběhla podle postupu uvedeném v kapitole 4.5.

Tabulka 25 uvádí procentuální zastoupení obsahu dusíku ve vzorcích, vypočítaného z rovnice 1. Nejvíce dusíku, a tedy i bílkovin bylo kvantifikováno u lněného semínka s obsahem 2,77 %. Nejnižší obsah dusíku byl zaznamenán v případě řasy hijiki, 1,40 %.

Tabulka 25: Obsah dusíku

Vzorek	*WN [%]
Arame	1,57
Kombu	1,52
Hijiki	1,40
Wakame	2,16
Chlorella	ND
Spirulina	ND
Vlašský ořech	2,58
Lněné semínko	2,77
Konopné semínko	*ND

*WN % = procentuální zastoupení obsahu dusíku ve vzorku, ND = nedetekováno

5.5 Stanovení celkových sacharidů podle Duboise

Další ze stanovovaných nutričních složek analyzovaných superpotravin jsou sacharidy. Sacharidy byly ve vzorcích stanoveny pomocí spektrofotometrické metody dle Duboise, jejíž postup uvádí kapitola 4.6. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Pro porovnání byly vzorky pro tuto analýzu macerovány ve vodě i v 20% ethanolu, jak uvádí Tabulka 26. Nejvyšší obsah sacharidů byl stanoven u řasy arame, což souhlasí u obou typů macerátů. Ve vodném macerátu byl obsah stanoven na $319,32 \pm 6,02$ mg/g, ve 20% ethanolu $1157,00 \pm 73,76$ mg/g. Nejnižší obsah sacharidů ve vodném macerátu byl stanoven u řasy kombu, kde koncentrace sacharidů dosahuje pouze hodnoty $37,25 \pm 3,01$ mg/g, což ale neodpovídá macerátu ve 20% ethanolu, kde byla koncentrace sacharidů stanovena až na $153,27 \pm 69,24$ mg/g. Nejnižší stanovený obsah sacharidů ve 20% ethanolovém macerátu byl nalezen u vzorku chlorelly a to $28,21 \pm 21,83$ mg/g. Po srovnání výsledků s referenčními hodnotami udávanými výrobcem výsledky příliš nekorrespondují, což mohlo být způsobeno nadstandartní citlivostí metody.

Tabulka 26: Výsledky stanovení obsahu sacharidů metodou dle Duboise

Vzorek	Koncentrace ve vodných macerátech c_v [mg/g]	Koncentrace v ethanolových macerátech c_e [mg/g]	Množství dané výrobcem m [mg/g]
Kombu	$37,25 \pm 3,01$	$153,27 \pm 69,24$	559
Hijiki	$39,91 \pm 17,31$	$106,97 \pm 0,75$	1
Arame	$319,32 \pm 6,02$	$1157,00 \pm 73,76$	447
Wakame	$46,30 \pm 27,85$	$125,60 \pm 28,60$	397
Chlorella	$67,59 \pm 6,77$	$28,21 \pm 21,83$	170
Spirulina	$46,83 \pm 12,04$	$40,98 \pm 9,78$	240
Vlašský ořech	$73,44 \pm 30,11$	$210,75 \pm 16,56$	–
Lněné semínko	$51,62 \pm 3,76$	$181,48 \pm 8,28$	289
Konopné semínko	$85,15 \pm 7,53$	$144,23 \pm 14,30$	64

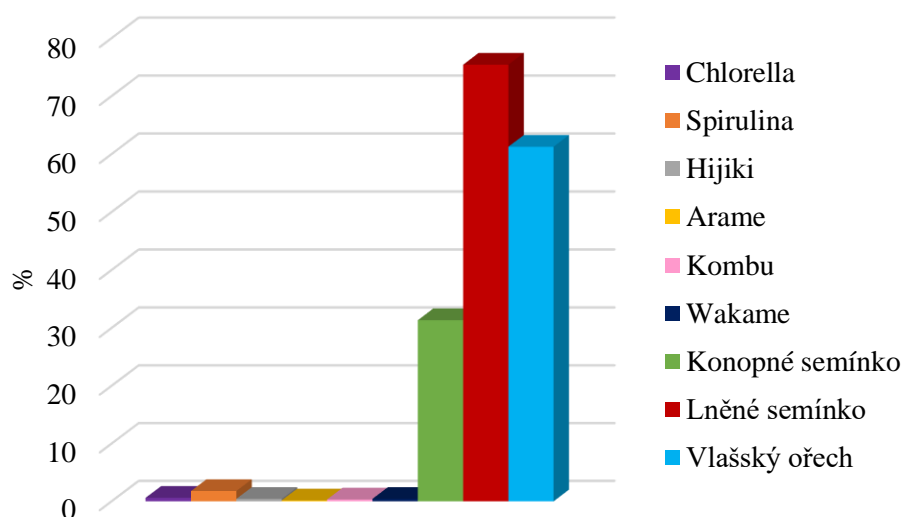
5.6 Stanovení celkového obsahu lipidů vážkovou metodou

Obsah lipidů ve vzorcích superpotravin byl stanoven vážkovou metodou u lipidových extraktů vytvořených podle postupu z kapitoly 4.2.2.

Nejvíce lipidů byla obsaženo ve vzorku lněného semínka, kde bylo stanoveno 75,43 % a nejméně pak bylo stanoveno ve vzorku arame, kde bylo detekováno pouze 0,16 % lipidů. Výsledky uvedené v následující Tabulka 27 jsou přehledně graficky znázorněny na Obrázek 29.

Tabulka 27: Obsah lipidů

Vzorek	%
Chlorella	0,62
Spirulina	1,78
Hijiki	0,43
Arame	0,16
Kombu	0,32
Wakame	0,43
Konopné semínko	31,35
Lněné semínko	75,43
Vlašský ořech	61,26



Obrázek 29: Procentuální zastoupení lipidů ve vybraných superpotravinách

5.7 Určení profilu mastných kyselin

Analýza obsahu mastných kyselin byla pro porovnání stanovena ve vzorcích biomasy i v lipidových extraktech, podle postupu uvedeného v kapitole 4.7. U velmi olejnatých potravin, které byly vybrány pro senzorickou analýzu byl navíc získán olej lisováním za studena, který byl též použit k analýze profilu mastných kyselin. Vzorky připravované k analýze mastných kyselin v biomase uvádí Obrázek 30.

Výčet identifikovaných mastných kyselin v jednotlivých typech vzorků je znázorněn v tabulkách v příloze 2. Pro lepší představu je rozdíl v analýze rozlišných typů vzorků demonstrován na příkladu lněného semínka, které bylo zpracováno všemi třemi způsoby. Toto srovnání lze pozorovat v grafech na Obrázek 31, Obrázek 32 a Obrázek 33.

Při porovnání vzorku lněného semínka stanoveného z biomasy a z lipidového extraktu je vidět, že v lipidovém extraktu byly navíc nalezeny 2 mastné kyseliny, konkrétně kyselina 10-heptadekenová (C 17:1) a kyselina k. γ -linolenová (C 18:3d6), v biomase naopak byla identifikována i kyselina elaidová (C 18:1t). Celkem bylo v lipidovém extraktu identifikováno 16 mastných kyselin, v biomase 15. Dále vidíme, že zastoupení identických kyselin ve vzorku není v obou typech identické. Jedná se zejména o kyselinu linolovou (C 18:2c), která tvoří 13,77 % obsahu mastných kyselin nalezených v biomase a 53,44 % obsahu v lipidovém extraktu, a kyselinu α -linolenovou (C 18:3d3) tvořící 51,23 % obsahu mastných kyselin nalezených v biomase a 17,76 % v lipidovém extraktu. To může být způsobeno například porušením buněčné stěny vzorků při agresivní hexanové extrakci s následným uvolněním většího množství mastných kyselin oproti vzorku biomasy, případně degradací některých kyselin při tomtéž procesu.

V případě kyseliny linolové (C 18:2c), která byla u předchozích analýz prokázána jako jedna z dominantních kyselin lněného semínka, se obsah stanovený ve vzorku zastudena lisovaného oleje blíží obsahu lipidového extraktu. Konkrétně představuje 59,58 % z celkového obsahu mastných kyselin. Kyselina α -linolenová (C18:3d3), která byla u předchozích analýz dominantní kyselinou, v lisovaném lněném oleji tvoří pouze minoritní složku, naopak kyselina eikosanová (C20:1), která byla v předchozích analýzách lněného semínka v minoritním zastoupení, zaujímá v lisovaném lněném oleji majoritní podíl. Jednotlivé analýzy daných vzorků jsou graficky znázorněny v příloze 2. Seznam analyzovaných mastných kyselin uvádí Tabulka 28.

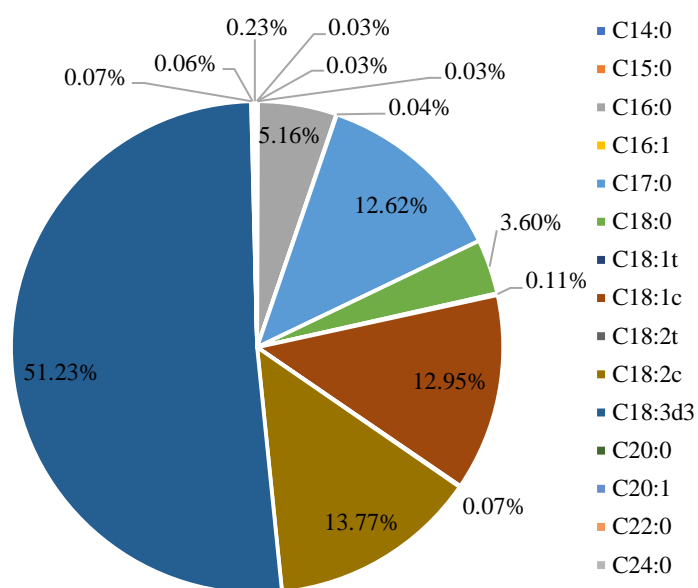
Z porovnání rozlišného zpracování vzorku pro identickou analýzu vyplývá, že je potřeba volit úpravu vzorku na základě kýženého výsledku s ohledem na individuální charakter obsažených mastných kyselin.

Tabulka 28: Seznam analyzovaných mastných kyselin

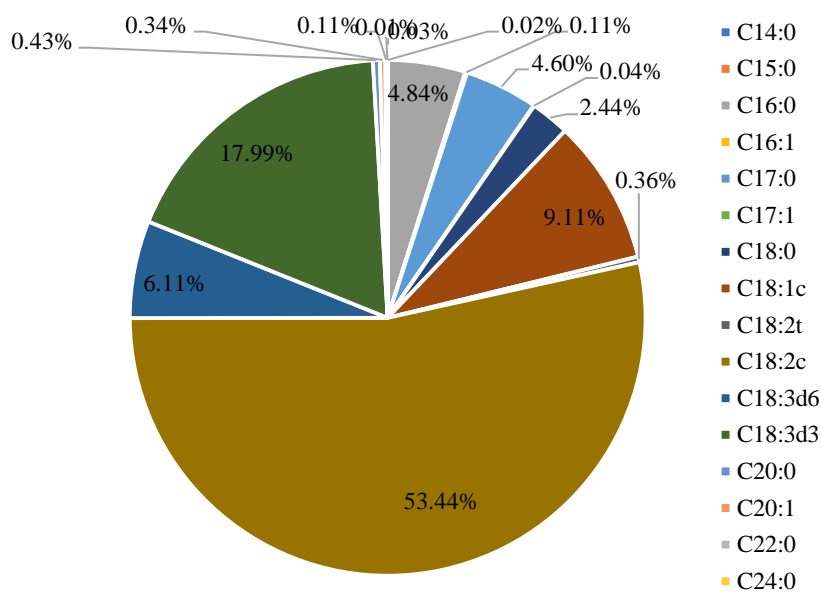
Kód kyseliny	Název kyseliny	Kód kyseliny	Název kyseliny
C6:0	k. hexanová	C18:2t	k. linolelaidová
C8:0	k. kaprylová	C18:3d3	k. α -linolenová
C10:0	k. kaprinová	C18:3d6	k. γ -linolenová
C11:0	k. undekanová	C20:0	k. arachidová
C12:0	k. dodekanová	C20:1	k. eikosanová
C14:0	k. myristová	C20:3d6	k. eikosatrienová
C15:0	k. pentadekanová	C20:4	k. arachidonová
C16:0	k. hexadekanová	C20:5	k. eikosapentaenová
C16:1	k. palmitová	C22:0	k. behenová
C17:0	k. heptadekanová	C22:2	k. dokosadienová
C17:1	10-heptadekenová	C22:6	k. dokosaheptaenová
C18:0	k. stearová	C23:0	k. trikosanová
C18:1c	k. olejová	C24:0	k. lignocerová
C18:1t	k. elaidová	C24:1	k. nervonová
C18:2c	k. linolová		



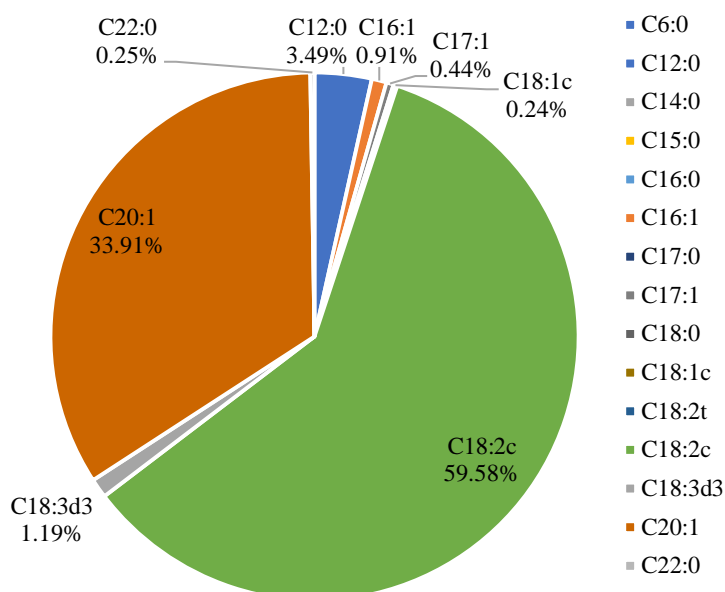
Obrázek 30: Vzorky biomasy připravované pro analýzu



Obrázek 31: Zastoupení mastných kyselin ve vzorku lněného semínka – biomasa



Obrázek 32: Zastoupení mastných kyselin ve vzorku lněného semínka – lipidový extrakt



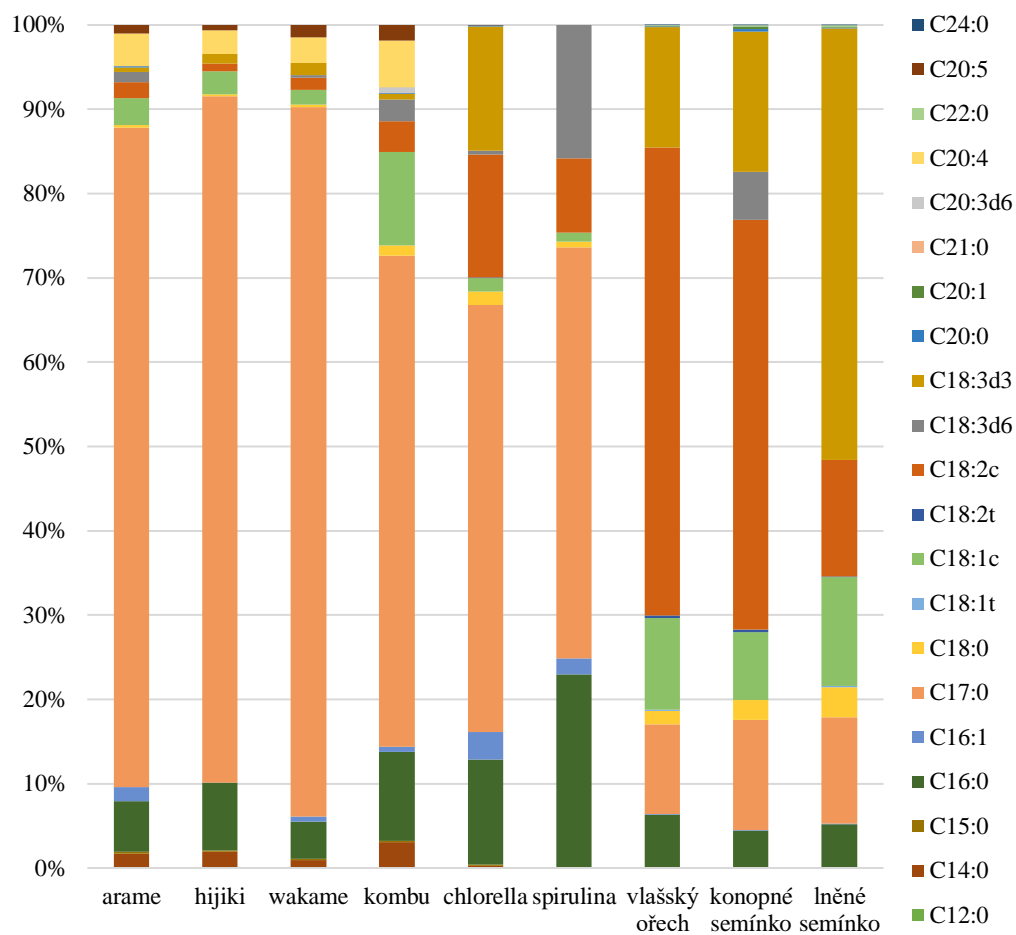
Obrázek 33: Zastoupení mastných kyselin ve vzorku lněného semínka – zastudena lisovaný olej

Obrázek 34 porovnává obsah mastných kyselin ve všech vzorcích analyzovaných z biomasy. Ve vzorcích řas lze pozorovat obdobné zastoupení dominantních mastných kyselin, zejména C14:0, C16:0, C17:0, C18:1c, C18:2c a C20:4, ve vzorcích Chlorella a Spirulina mají vysoký obsah též kyseliny C18:3d3 a C18:3d6.

Analogické zastoupení kyselin se vyskytuje též u vzorků konopné semínko, lněné semínko a vlašský ořech. Podobně jako u řas, i zde jsou dominantními složkami kyseliny C16:0, C17:0, C18:1c a zejména C18:2c, C18:3d3 a C18:3d6. Množství mastných kyselin a zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin je zobrazeno v Tabulka 29.

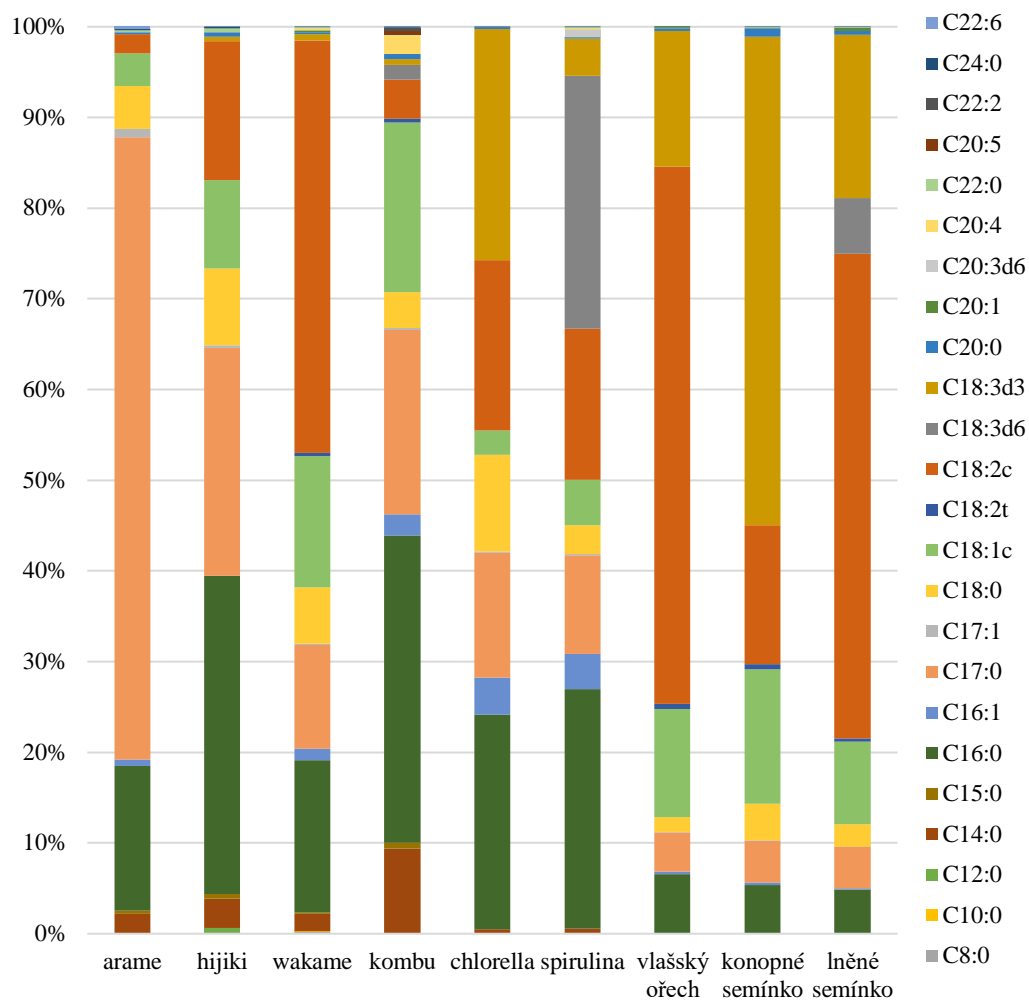
Tabulka 29: Množství FA a zastoupení nasycených/nenasycených FA

Vzorek	FA [mg/g]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
Vlašský ořech	819,30	9,04	12,45	78,51
Lněné semínko	713,82	10,47	15,05	74,48
Konopné semínko	720,04	8,46	9,62	81,92
Spirulina	144,45	46,13	5,78	48,10
Chlorella	158,65	29,74	9,70	60,57
Kombu	86,40	36,17	28,03	35,81
Wakame	108,08	36,36	15,03	48,61
Hijiki	86,44	55,72	14,75	29,53
Arame	85,38	38,16	22,65	39,19



Obrázek 34: Biomasa

V případě analýzy vzorků připravených z lipidových extraktů jsou majoritní kyseliny všech vzorků kyselina C16:0 a kyselina C17:0. Ve většině vzorků jsou majoritní též kyseliny C18:0, C18:1c, C18:2c, u vzorků lněného semínka, konopného semínka, vlašského ořechu, chlorelly a spiruliny také C18:3d3 a C18:3d6. Ve vzorcích řas se objevují i C14:0 a C16:1. Analýza vzorků připravených z hexanových extraktů je uvedena na Obrázek 35, množství mastných kyselin a zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin je zobrazeno v Tabulka 30.



Obrázek 35: Lipidové extrakty

Tabulka 30: Množství FA a zastoupení nasycených/nenasycených FA

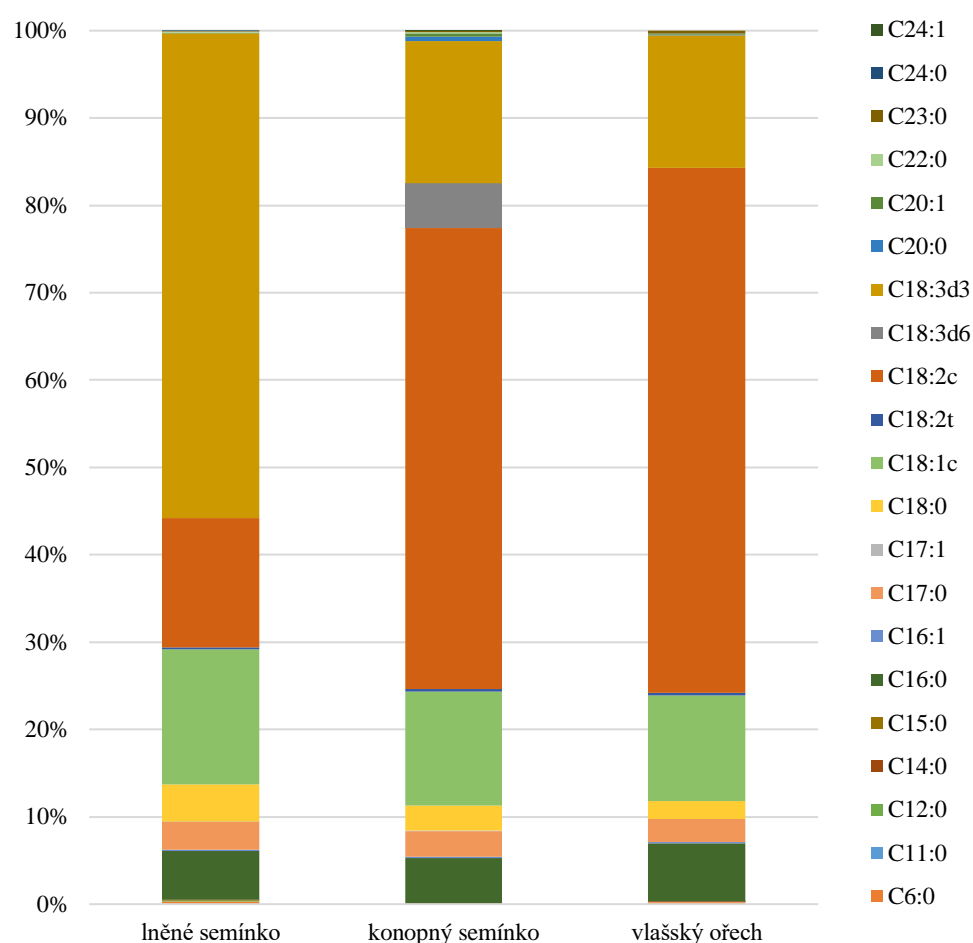
Vzorek	FA [mg/g]	SFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]
Vlašský ořech	326,19	8,88	12,97	78,16
Lněné semínko	468,58	8,27	10,07	81,66
Konopné semínko	373,69	10,96	15,96	73,09
Spirulina	77,71	34,14	10,25	55,60
Chlorella	48,99	40,67	8,02	51,31
Kombu	35,68	60,96	26,78	12,26
Wakame	56,71	29,09	18,07	52,84
Hijiki	34,96	63,39	13,49	21,13
Arame	23,42	75,80	16,73	7,48

Za studena lisované oleje byly vylisovány ze vzorků vlašský ořech, lněné semínko a konopné semínko. Majoritní kyseliny všech vzorků jsou kyselina C16:0, C17:0, C18:0, C18:1c a zejména C18:2c. Vysoký

podíl tvoří též C18:3d3. Analýza vzorků připravených z lisovaných olejů je uvedena na Obrázek 36, množství mastných kyselin a zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin je zobrazeno v Tabulka 31.

Tabulka 31: Mastné kyseliny v zastudena lisovaných olejích

Vzorek	Vlašský ořech	Lněné semínko	Konopné semínko
Celkový obsah FA [mg/g]	326,91	279,34	291,04
SFA [%]	9,61	10,90	9,23
MUFA [%]	12,75	16,24	14,01
PUFA [%]	77,64	72,86	76,76



Obrázek 36: Zastudena lisované oleje

5.8 Antimikrobiální testy

Pro antimikrobiální testy byly zvoleny bakterie *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermis* a *Escherichia coli*. Maceráty použité pro antimikrobiální testy byly vodné i z 20% ethanolu. Postup uvádí kapitole 4.8. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr.

Průkaznost antimikrobiálního účinku v Tabulka 32 je znázorněna použitím symbolu „+“. Pro inhibiční účinek do 20 % je použito „+“, pro účinek v rozmezí 20–40 % „++“, rozmezí 40–60 % „+++“, 60–80 % „++++“, 80 % a vyšší účinek je znázorněn „+++++“.

U bakterie *Escherichia coli* byl antimikrobiální účinek prokázán u macerátu chlorelly, spiruliny, konopného semínka a lněného semínka ve 20% ethanolu. Inhibice u těchto vzorků byla 100 %. U vodných macerátů byl projeven pouze antimikrobiální účinek do 80 % pro vzorek spiruliny.

U bakterie *Micrococcus luteus* se antimikrobiální účinek projevil do 80 % inhibice u macerátů spiruliny a to jak u vodného, tak ethanolového. Nízký účinek byl stanoven taktéž u ethanolového macerátu řasy arame.

Tabulka 32: Výsledky antimikrobiálního testu

MO	EC		ML		SM		SE	
Prostředí	Ethanol	Voda	Ethanol	Voda	Ethanol	Voda	Ethanol	Voda
Hijiki	–	–	–	–	–	–	–	–
Wakame	–	–	–	–	–	–	+	–
Vlašský ořech	–	–	–	–	+++	–	+	–
Arame	–	–	+	–	–	–	++++	–
Chlorella	+++++	–	–	–	+	–	–	–
Konopné semínko	+++++	–	–	–	++	–	+++++	–
Kombu	–	–	–	–	–	–	++++	–
Spirulina	+++++	++++	++++	++++	+++++	+++++	+++++	++
Lněné semínko	+++++	–	–	–	+	+	+++++	–

Maceráty spiruliny obojího druhu prokázali maximální antimikrobiální účinek u bakterie *Serratia marcescens*. Účinnost do 60 % byla detekována též u macerátu vlašského ořechu ve 20% ethanolu a do 40 % antimikrobiálního účinku se prokázal vhodný též ethanolový macerát konopného semínka. Ethanolový macerát chlorelly vykazoval účinek do 20 %, stejně tak jako i oba typy macerátů u vzorku lněného semínka.

Bakterie *Staphylococcus epidermis* byla maximálně inhibována ethanolovým macerátem konopného semínka, lněného semínka a spiruliny, nepatrně méně pak působily inhibičně maceráty arame a kombu

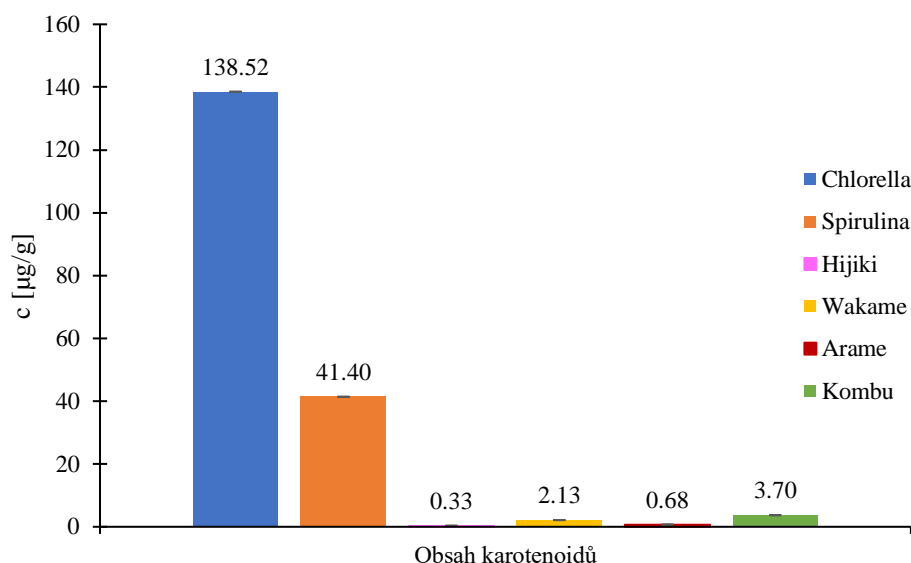
ve 20% ethanolu. Účinek do 40 % inhibice pak byl prokázán u vodného macerátu spiruliny. Do 20 % inhibice byl stanoven antimikrobiální účinek u ethanolových macerátů wakame a vlašského ořechu.

U všech mikroorganismů se projevil antimikrobiální účinek řasy spiruliny, vysoký antimikrobiální účinek lze též připsat lněnému semínku, konopnému semínku a vlašskému ořechu, jelikož vykazují pozitivní reakci u tří ze čtyř použitých mikroorganismů. Nejnižší antimikrobiální účinek pak projevovала řasa hijiki. Obecně lze říci, že vyšší antimikrobiální účinek se projevuje u macerátů z 20% ethanolu.

5.9 Spektrofotometrické stanovení obsahu karotenoidů a chlorofylů

Pigmenty typické pro řasy, jako jsou karotenoidy a chlorofyly, jsou významné bioaktivní látky. Obsah pigmentů ve vzorcích byl stanoven podle postupu z kapitoly 4.9. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Koncentrace zastoupených karotenoidů v $\mu\text{g/g}$ uvádí Obrázek 37.

Nejvyšší obsah karotenoidů byl prokázán ve vzorku chlorelly, kde stanovená koncentrace dosahuje hodnoty 138,52 $\mu\text{g/g}$. Nejnižší zastoupení karotenoidů se nachází v řase hijiki, kde byla koncentrace karotenoidů stanovena 0,33 $\mu\text{g/g}$.



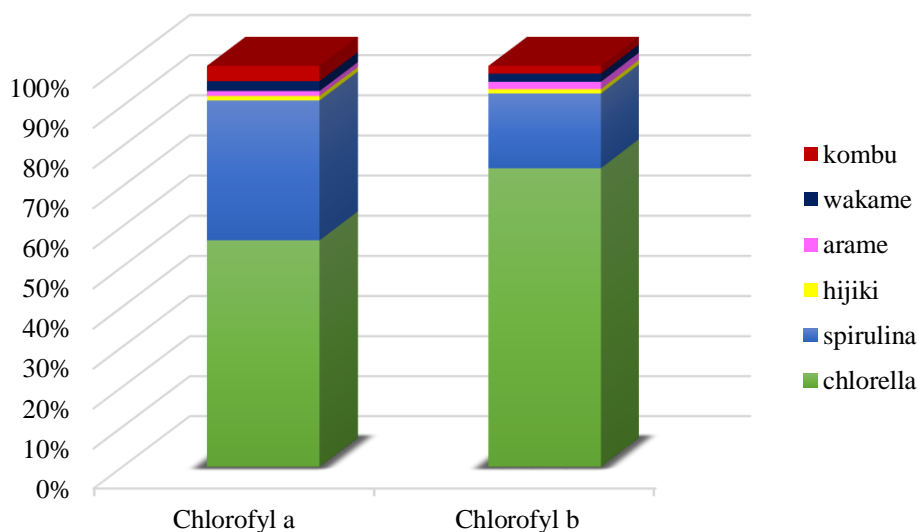
Obrázek 37: Grafické znázornění obsahu karotenoidů

Stanovení obsahu chlorofylů bylo provedeno též na základě postupu z kapitoly 5.8. Z výsledků uvedených v Tabulka 33 lze vyčíst, že u všech vzorků výrazně převládá chlorofyl a oproti chlorofylu b. Pořadí vzorků s ohledem na obsah chlorofylu a je totožné jako pořadí podle obsahu chlorofylu b a tím pádem odpovídá též pořadí podle celkového obsahu chlorofylů. Nejvyšší obsah celkových chlorofylů byl zaznamenán u vzorku chlorelly, konkrétně 119,25 mg/ml, kde 85,73 mg/ml tvoří chlorofyl a. Následuje vzorek spiruliny s koncentrací chlorofylů 61,22 mg/ml, přičemž 52,84 mg/ml tvoří chlorofyl a. Nejnižší zastoupení chlorofylů bylo stanoveno u řasy hijiki, kde byl obsah chlorofylů stanoven pouze 2,15 mg/ml, z čehož 1,68 mg/ml zabírá chlorofyl a.

Na základě hodnot uvedených v Tabulka 33, lze říci, že obsah karotenoidů kopíruje obsah chlorofylů ve vzorcích. Z Obrázek 38 lze vyčíst, že dominantním chlorofylem analyzovaných vzorků řas je chlorofyl a.

Tabulka 33: Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů ve vzorcích řas

vzorek	Chlorofyl a c [mg/g]	Chlorofyl b c [mg/g]	Celkový obsah chlorofylů c [mg/g]	Karotenoidy c [μg/g]
Chlorella	85,73	33,55	119,25	$138,52 \pm 7,59 \cdot 10^{-5}$
Spirulina	52,84	8,39	61,22	$41,40 \pm 9,84 \cdot 10^{-5}$
Hijiki	1,68	0,48	2,15	$0,33 \pm 1,55 \cdot 10^{-5}$
Arame	1,87	0,83	2,69	$2,13 \pm 3,1 \cdot 10^{-5}$
Wakame	3,72	0,91	4,63	$0,68 \pm 3,23 \cdot 10^{-5}$
Kombu	5,79	0,88	6,67	$3,70 \pm 6,20 \cdot 10^{-5}$



Obrázek 38: Obsah chlorofylů ve vzorcích řas

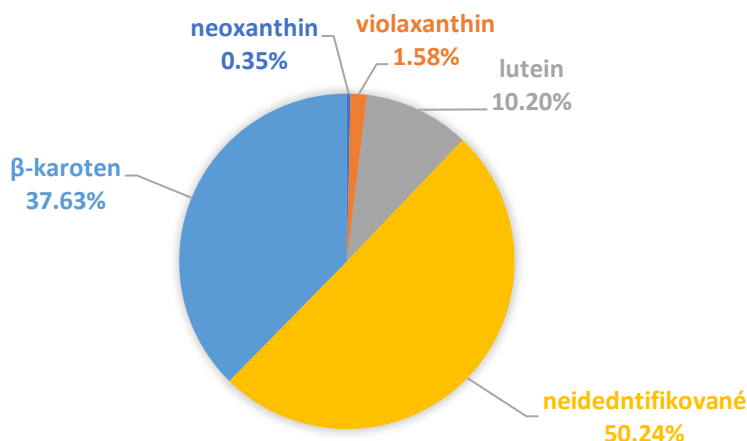
5.10 Analýza obsahu pigmentů pomocí HPLC

Obsah bioaktivních látek, který byl prokázán již spektrofotometrickým stanovením byl ověřen pomocí metody HPLC, která rovněž umožnila identifikaci zastoupených látek.

Stanovení karotenoidů a chlorofylů a jejich identifikace pomocí HPLC bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.10.1.

Celkem bylo ve vzorcích identifikováno 5 typů karotenoidů, které byly kvantifikovány podle kalibračních rovnic. Jedná se o neoxanthin, violaxanthin, lutein, betakaroten a dále soubor neidentifikovaných karotenoidů. Nejvyšší obsah karotenoidů byl zachycen u vzorku chlorelly, jak tomu bylo též při spektrofotometrickém stanovení. Konkrétně bylo v tomto vzorku kvantifikováno 9214,04 μg/g. Nejnížší obsah karotenoidů byl zaznamenán ve vzorku wakame 0,64 μg/g.

Z výše vyjmenovaných karotenoidů byl u všech vzorků identifikován lutein a β -karoten. Neobvyklý není ani výskyt neidentifikovaných karotenoidů. Co se týče rozmanitosti vzorků, všechny karotenoidy byly stanoveny u vzorků chlorelly a spiruliny. U vzorku kombu se vyskytují všechny zmíněné karotenoidy s výjimkou violaxanthinu. Zastoupení karotenoidů vzorku chlorelly znázorňuje Obrázek 39, další vzorky jsou graficky znázorněny v příloze 3.



Obrázek 39: Obsah karotenoidů ve vzorku chlorella

Rovněž byl analyzován obsah chlorofylů. Nejvyšší koncentrace chlorofylů byla vyhodnocena u vzorku chlorelly, kde byla stanovena koncentrace 29 532,65 $\mu\text{g/g}$ a nejnižší koncentrace chlorofylů byla zaznamenána u vzorku hijiki, konkrétně 9,55 $\mu\text{g/g}$. Tyto výsledky korespondují s výsledky spektrofotometrického stanovení. Výsledky obsahu karotenoidů a chlorofylů jsou shrnuty v Tabulka 34.

Tabulka 34: Obsah karotenoidů a chlorofylů

Vzorek	Karotenoidy a chlorofyly [$\mu\text{g/g}$]					
	Arame	Hijiki	Wakame	Kombu	Chlorella	Spirulina
Neoxanthin				3,21	32,56	14,29
Violaxanthin					145,45	7,16
Lutein	1,35	0,72	0,64	1,20	939,59	28,95
Neidentifikované				146,24	4 628,93	1 778,28
β -karoten	205,27			151,52	3 467,51	1 686,46
Karotenoidy celkem	206,61	0,72	0,64	302,16	9 214,04	3 515,13
Chlorofyly	45,36	9,55	54,73	17,22	29 532,65	7 015,96

5.11 Senzorická analýza

Doplňky stravy s obsahem řas a mastných kyselin byly podrobeny senzorické analýze, celkově vzorky hodnotilo 21 proškolených hodnotitelů, přičemž jejich věk a preference uvádí následující Tabulka 35. 57,14 % zúčastněných bylo z řad studentů, zbytek tvořili akademici. Nejvíce hodnotitelů uvedlo, že doplňky stravy obohacené o mastné kyseliny užívá občas. 71,43 % hodnotitelů uvedlo, že má velmi rádo nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny, nikdo neuvedl, že by tyto cukrovinky rád neměl.

Tabulka 35: Shrnutí odpovědí hodnotitelů senzoričké analýzy

	Hodnotitel		Frekvence užívání			Oblíbenost		
	Student	Akademik	Často	Občas	Vůbec	Má velmi rád	Příliš nemá rad	Vůbec nemá rád
Počet hodnotitelů	12	9	6	11	4	15	6	0
% zastoupení	57,14	42,86	28,57	52,38	19,05	71,43	28,57	0,00



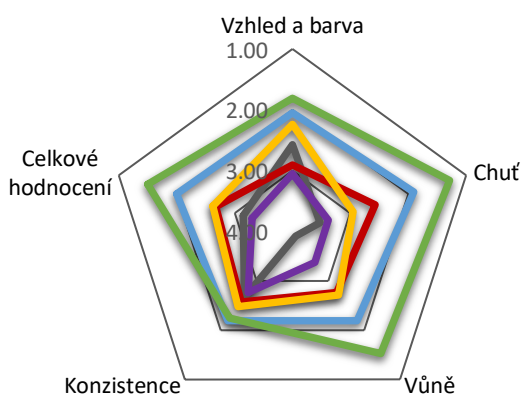
Obrázek 40: Vzhled připravených částic s přidavkem mastných kyselin

Hodnoceno bylo šest vzorků o složení uvedeném v kapitole 4.11. Vyrobené preparáty uvádí Obrázek 40. První část hodnocení posuzovala vlastnosti preparátů jako je vzhled, chuť, vůně a konzistence. Pro tuto část analýzy byl vybrán stupnicový test od 1 do 5, kde 1 znamená nejlepší, 5 nejhorší. Hodnocení připravených preparátů bylo zprůměrováno a je znázorněno v Tabulka 36, grafické vyhodnocení je znázorněno pomocí paprskovitého grafu na Obrázek 42. Hodnota 1, značící nejlepší výsledek, je v grafu okrajová hodnota a hodnota 5 nevyhovující, je zaznamenána ve středu grafu. Z grafu lze vyčíst, že při hodnocení vůně, chutě i při celkovém hodnocení, byl jako nejlepší vzorek vyhodnocen vzorek F01 s hodnocením 1,50. Následují vzorky E01, D01, C01, A01 a B01 se známkami 2,00; 2,63; 2,68 a 3,15. V případě vzhledu a konzistence jsou vzorky F01 a E01 hodnoceny velmi podobně, nicméně nejlepší hodnocení v konzistenci měl vzorek E01 s hodnocením 2,19, vzhled byl vyhodnocen nejlepší u vzorku F01 s hodnocením 1,81. Nejhorše pak v celkovém hodnocení dopadl vzorek B01 se známkou 3,30, taktéž měl nejhorší hodnocení konzistence (2,76) a vzhledu (3,05). Nejhorší hodnocení chutě a vůně získal vzorek A01, konkrétně 3,52 za chuť a 3,90 za vůni.

Dále byla zhodnocena textura vzorků od jedné do pěti, kdy 1 = příliš měkká a 5 = příliš tvrdá. Nejtvrdší byl vyhodnocen vzorek A01, s hodnocením 3,62 a nejvíce měkký vzorek F01. Ideální textura by se měla pohybovat u hodnoty 3, tedy střední. Na Obrázek 42 lze vidět, že nejvíce se této hodnotě přiblížil vzorek B01 s průměrným ohodnocením 3,00.

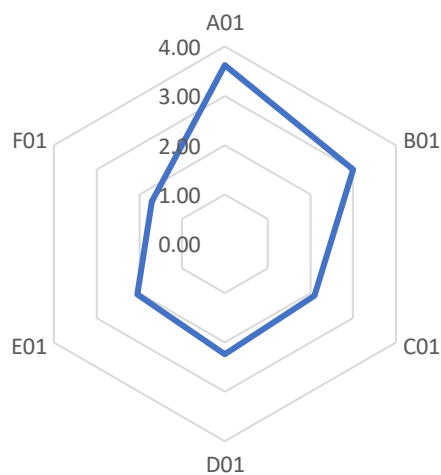
Tabulka 36: Průměrné hodnocení vybraných vlastností medvídků

Kód vzorku	Vzhled a barva	Chuť	Vůně	Konzistence	Celkové hodnocení	Textura
A01	2,57	3,52	3,90	2,67	3,15	3,62
B01	3,05	3,38	3,38	2,76	3,30	3,00
C01	2,90	2,57	2,76	2,57	2,68	2,10
D01	2,24	2,95	2,71	2,48	2,63	2,24
E01	2,05	1,90	2,19	2,19	2,00	2,05
F01	1,81	1,29	1,52	2,24	1,50	1,71



— A01 — B01 — C01 — D01 — E01 — F01

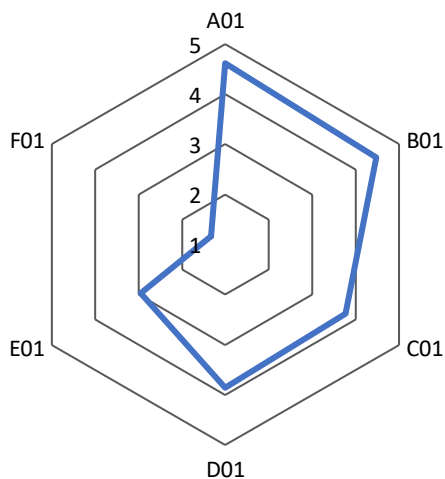
Obrázek 41: Výsledky senzorkého hodnocení vybraných vlastností medvídků



Obrázek 42: Hodnocení konzistence vyrobených preparátů

Nakonec byl proveden pořadový test, jehož výsledky uvádí paprskovitý graf na Obrázek 43. Pořadí bylo stanoveno vzestupně, kde 1 značí nejlepší výsledek a v grafu se vyskytuje ve středu. Jako celkově nejlepší preparát byl vyhodnocen vzorek s označením F01, nejhůře dopadl vzorek označen A01.

Nejlépe hodnocený vzorek F01 byl často popisován jako chutný, s příchutí citrusů, manga nebo tropického ovoce. Nejhůře hodnocený vzorek B01 byl často přirovnáván k chuti trávy, sena.



Obrázek 43: Pořadový test zhotovených preparátů

5.11.1 Návrh finálního podoby doplňku stravy

Vzhledem k výsledkům sensorické analýzy, kdy dopadl nejlépe vzorek s mangovou příchutí, obohacený o extrakt wakame, by nový doplněk stravy pro děti mohl obsahovat obdobné složení. Tvar medvídku napodobuje vzhled, na který jsou děti zvyklé u cukrovinek a může pozitivně ovlivnit atraktivitu doplňku stravy. Jelikož použitý macerát řasy wakame dle analýzy profilu mastných kyselin obsahuje esenciální ω -3 mastné kyseliny, k. α -linolenovou a k. eikosapentaenovou, je vhodným zdrojem pro jejich suplementaci. Dále řasa vykazuje antioxidační aktivitu, což podpoří trvanlivost mastných kyselin.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala vývojem doplňků stravy s obsahem řas a vybraných aktivních látek pro dětskou výživu. Z velké části se práce věnovala optimalizaci extrakce vybraných bioaktivních látek a dále charakterizaci vybraných superpotravin z nutričního hlediska. Jako superpotraviny byly v této práci vybrány řasy arame, kombu, wakame, hijiki a chlorella, dále spirulina, lněné semínko, konopné semínko a vlašský ořech.

V první části práce byl proveden screening na trhu dostupných doplňků stravy s obsahem omega-3 mastných kyselin určených pro dětské spotřebitele. Bylo zjištěno, že většina těchto doplňků je určena až pro děti od věku 3 let, často se vyskytuje ve formě tobolek či želatinových kapslí s ovocnou příchutí a aroma.

Dále byl optimalizován výběr vhodného typu extraktu. Optimalizace sledovala obsah polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivitu u vybraných vzorků řas. Po provedení optimalizace byly jako nejvhodnější zvoleny 24hodinové maceráty s využitím vody a 20% ethanolu jako rozpouštědla.

Následně byly připraveny extrakty ze všech zvolených superpotravin a charakterizovány pomocí spektrofotometrických analýz. Nejvyšší koncentrace polyfenolů $11,61 \pm 0,00$ mg/g byla stanovena v ethanolovém macerátu vzorku arame, koncentrace flavonoidů byla nejvyšší v případě téhož vzorku, kde bylo stanoveno $8,96 \pm 0,46$ mg/g. Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity byla detekována u vodného macerátu vzorku vlašský ořech, ve kterém byla koncentrace stanovena $4,13 \pm 0,00$ mg/g. Těmto analýzám byly podrobeny též lipidové. V případě těchto extraktů byly výsledky následující. Nejvíce polyfenolů bylo stanoveno ve vzorku lněné semínko, $14,15 \pm 0,65$ mg/g oleje. Antioxidační aktivita pak byla prokázána nejvyšší též u lněného semínka, ve kterém byla stanovena hodnota $7,12 \pm 0,32$ mg/g.

Ze všech typů extraktů byly následovně připraveny lipozomy, u kterých byla stanovena průměrná velikost částic, polydisperzita, stabilita, enkapsulační účinnost a dlouhodobá stabilita po třech měsících skladování. Průměrná velikost připravených lipozomů se pohybuje v rozmezí 202,93–426,73 nm. Na základě získaných hodnot měření zeta potenciálu je možné říci, že takřka všechny testované lipozomy byly stabilní. Dále byla měřením koncentrace polyfenolů u lipozomů stanovena enkapsulační účinnost. Celkově lze konstatovat, že u všech lipozomů se podařilo enkapsulovat aktivní látky s účinností nad 59 %.

Dlouhodobá stabilita lipozomů byla ověřena kontrolou antioxidační aktivity, stanovením množství uvolněných polyfenolů a rovněž analýzou zeta potenciálů. Při kontrole stability měření zeta potenciálů byly všechny lipozomy stabilní, rovněž antioxidační aktivita byla u lipozomů zachována, nicméně při stanovení množství uvolněných polyfenolů bylo u některých vzorků zaznamenáno uvolňování aktivních látek z lipozomů v průběhu skladování. Pro prodloužení trvanlivosti těchto vzorků by bylo možné využít například lyofilizaci.

Vzorky řas byly analyzovány také pro obsah karotenoidů a chlorofylů. Ze spektrofotometrického stanovení bylo vyhodnoceno, že nejvyšší obsah karotenoidů, 138,16 µg/ml, se nacházeli ve vzorku chlorella, nejnižší koncentrace pak byla detekována ve vzorku hijiki, 0,33 µg/ml. Obdobně vyšla i analýza obsahu chlorofylů, kde ve vzorku chlorelly bylo stanoveno 119,25 mg/ml chlorofylů, z nichž dominantní byl chlorofyl a, který tvořil 86,73 mg/ml. Nejnižší koncentrace chlorofylů pak byla opět u vzorku hijiki, kde byl obsah chlorofylů stanoven pouze na 2,15 mg/ml. Tyto výsledky byly také ověřeny pomocí HPLC.

Pro upřesnění celkového nutričního charakteru vybraných superpotravin byly vzorky podrobeny analýzám pro stanovení celkového obsahu sacharidů metodou dle Duboise, obsahu bílkovin pomocí Kjeldahlovy metody. Největší důraz byl však kladen na určení profilu mastných kyselin.

Pomocí plynové chromatografie byl určen profil mastných kyselin. Pro toto stanovení byly použity lipidové extrakty a též byla analýza provedena přímo z biomasy. U vysoce olejnatých potravin vybraných pro senzorickou analýzu byl navíc získán i olej lisováním za studena, který byl rovněž použit pro analýzu profilu mastných kyselin. Jednalo se o vzorky lněné semínko, konopné semínko a vlašský ořech. Při porovnání výsledků lipidových extraktů a výsledků z analýzy biomasy byly zjištěny zejména množství rozdíly obsažených mastných kyselin. Při porovnání s analýzou zastudena lisovaného oleje se výsledné profily mastných kyselin blížily spíše výsledkům lipidových extraktů. Nejvyšší obsah ω-3 mastných kyselin byl pak stanoven ve vzorku arame, kde byly detekovány i kyseliny eikosapentaenová a dokosaheptaenová. Kyselina eikosapentaenová byla spolu s kyselinou α-linolenovou stanovena též ve vzorcích hijiki, wakame a kombu.

Na závěr byla provedena senzorická analýza vytvořených alginátových doplňků stravy ve tvaru medvídků obohacených o extrakty z řas a zastudena lisovaných olejů s vyšším obsahem ω-3 a ω-6 mastných kyselin. V rámci senzorické analýzy byl hodnocen vzhled, textura, chuť a celkový dojem. Lepší senzorické hodnocení obecně získaly vzorky obohacené pouze o extrakty z řas oproti vzorkům obohaceným i o olej. Vzhledem k výsledkům senzorické analýzy, kdy byl jako nejlepší vyhodnocen vzorek s mangovou příchutí, obohacený o extrakt wakame, by nový doplněk stravy pro děti mohl obsahovat obdobné složení. Tvar medvídku napodobuje vzhled, na který jsou děti zvyklé u cukrovinek a může pozitivně ovlivnit atraktivitu daného doplňku stravy. Jelikož použitý macerát řasy wakame dle analýzy profilu mastných kyselin obsahuje esenciální ω-3 mastné kyseliny, k.α-linolenovou a k. eikosapentaenovou, je velmi vhodným zdrojem pro jejich suplementaci. Dále řasa vykazuje antioxidační aktivitu, což podpoří trvanlivost mastných kyselin.

Co se týče možností pokračování v tématice dětských doplňků stravy, jednou z možností je dále využít i připravených lipozomových částic a obohatit tak přípravky i o další aktivní látky.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Fruhauf, Pavel a kolektiv. 2003. *Fyziologie a patologie dětské vydání*. Praha : Univerzita karlova, 2003. str. 33. Sv. 1. ISBN 80-246-00692.
- [2] TLÁSKAL, CSc., MUDr. Petr. Výživa v dětství a adolescenci. Euro.cz [online]. Praha: Mladá fronta, 10.10.2007 [cit. 2019-02-03]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/vyziva-v-detstvi-a-adolescenci-323594>
- [3] Fraňková, S., Pařízková, J., & Malichová, E. 2013. Jídlo v životě dítěte a adolescenta: teorie, výzkum, praxe. Praha : Karolinum, 2013. str. 302. Sv. 1. ISBN 978-80-246-2247-7.
- [4] Nevoral, J., Aldhoon Hainerová , I., Bláhová, K., Bosáková, A., Bronský, J., Fencel, F. ... Zlatohlávková, B. 2013. Praktická pediatrická gastroenterologie, hepatologie a výživa. Praha : Mladá fronta, 2013. Sv. 1. ISBN 978-80-204-2863.
- [5] MEYER, Barbara J., Neil J. MANN, Janine L. LEWIS, Greg C. MILLIGAN, Andrew J. SINCLAIR a Peter R.C. HOWE. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. Australia, 2003, 38(4), 391-398.
- [6] Alga. Mikrobiologický ústav AV ČR [online]. Praha: inoWeb, 2014 [cit. 2019-02-02]. Dostupné z: <https://www.alga.cz/c-548-co-vite-o-rasach-.html>
- [7] Textbook of Algae. New Delhi: I.K. International Pvt., 2005. ISBN 81-88237-44-2.
- [8] ERNÁNDEZ-SEGOVIA, Isabel, María Jesús LERMA-GARCÍA, Ana FUENTES a Jose M. BARAT. Characterization of Spanish powdered seaweeds: Composition, antioxidant capacity and technological properties. *Food Research International*. 2018, 111, 212-219. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.037. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918304058>
- [9] LEY, Beth M. Chlorella: The Ultimate Green Food : Nature's Richest Source of Chlorophyll, DNA & RNA: A Health Learning Handbook. USA: BL Publications, 2003. ISBN 1890766283.
- [10] PANAHI, Yunes, Behrad DARVISHI, Narges JOWZI, Fatemeh BEIRAGHDAR a Amirhossein SAHEBKAR. Chlorella vulgaris: A Multifunctional Dietary Supplement with Diverse Medicinal Properties. *Current Pharmaceutical Design*[online]. 2015, 22(2), 164-173 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.2174/1381612822666151112145226. ISSN 13816128. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=22&issue=2&spage=164>
- [11] GERSHWIN, M. Eric a Amha BELAY. Spirulina in human nutrition and health. Boca Raton: CRC Press, c2008. ISBN 9781420052565.
- [12] ZHENG, Tao, Cheng Chu LIU, Jing Ya YANG, Qi Gen LIU a Jia Le LI. Hijiki Seaweed (*Hizikia fusiformis*): Nutritional Value, Safety Concern and Arsenic Removal Method. *Advanced Materials Research*. 2013, 634-638, 1247-1252. DOI:

- 10.4028/www.scientific.net/AMR.634-638.1247. ISSN 1662-8985. Dostupné také z: <https://www.scientific.net/AMR.634-638.1247>
- [13] MOURITSEN, Ole G., Prannie RHATIGAN a José Lucas PÉREZ-LLORENS. World cuisine of seaweeds: Science meets gastronomy. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2018, 14, 55-65. DOI: 10.1016/j.ijgfs.2018.09.002. ISSN 1878450X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878450X18301173>
- [14] KUMIKO, Kato, Masahiro HAYASHI, a Hiroaki MASUNAGA. A novel method for producing softened edible seaweed kombu. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, (65), 618-623. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.059>. ISSN 0023-6438.
- [15] WEINBERGER, Tamar a Scott SICHERER. Current perspectives on tree nut allergy: a review. *Journal of Asthma and Allergy*. New York: Dovepress, 2018, 11, 41-51. DOI: 10.2147/JAA.S141636. ISSN 1178-6965. Dostupné také z: <https://www.dovepress.com/current-perspectives-on-tree-nut-allergy-a-review-peer-reviewed-article-JAA>
- [16] GAMA, Tsvakai, Helen M. WALLACE, Stephen J. TRUEMAN a Shahla HOSSEINI-BAI. Quality and shelf life of tree nuts: A review. *Scientia Horticulturae*. 2018, 242, 116-126. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.07.036. ISSN 03044238. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423818305429>
- [17] GEISELHART, Sabine, Karin HOFFMANN-SOMMERGRUBER a Merima BUBLIN. Tree nut allergens. *Molecular Immunology*. 2018, 100, 71-81. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.03.011. ISSN 01615890. Dostupné tak z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589018300907>
- [18] PRUGAR, Jaroslav a akademie zemědělských věd ČESKÁ. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2008. ISBN 9788086576282.
- [19] RODRIGUEZ-LEYVA, Delfin a Grant N. PIERCE. The cardiac and haemostatic effects of dietary hempseed. *Nutrition & Metabolism* [online]. 2010, roč. 7, č. 1, s. 32 [vid. 7. duben 2014]. ISSN 1743-7075. Dostupné z: doi:10.1186/1743-7075-7-32
- [20] CALLAWAY, J. C. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* [online]. 2004, roč. 140, č. 1-2, s. 65–72 [vid. 7. duben 2014]. ISSN 0014-2336, 1573- 5060. Dostupné z: doi:10.1007/s10681-004-4811-6
- [21] HONCŮ, Iva, Marcela SLUKOVÁ a Lucie KREJČÍŘOVÁ. Len setý - jeho význam z hlediska výživy a zdraví. *Výživa a potraviny*. 2013, roč. 68, č. 6, s. 161–163.
- [22] GURR, M. I., John L. HARWOOD a K. N. FRAYN. *Lipid biochemistry*. 5th ed. Malden, Mass.: Blackwell Science, 2002. ISBN 0632054093.
- [23] Gunstone, Frank D., John L. HARWOOD a Albert J. DIJKSTRA. *The Lipid Handbook with CD-ROM*. 3. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 978-0-8493-9588.

- [24] THOMPSON, Thomas E. Lipid. In: Encyclopedia Britannica [online]. UK: Encyclopedia Britannica, 12.10. 2018 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/lipid>
- [25] Handbook of Lipids in Human Function. Watson R, De Meester F. 2016. Academic Press, 225 Wyman St, Waltham, MA 02451. Book, 809 pp, \$166, ISBN: 978-1-63067-036-8.
- [26] VOET Donald., VOETOVÁ Judith G. Biochemie. 1. české vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9
- [27] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science [online]. 2011, č. 1, s. 1806-1815 [cit. 2014-01-31]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665>
- [28] SCHROOYEN, P. M. M., R. van der MEER a C. G. De KRUIF. Microencapsulation: its application in nutrition. Proceedings of the Nutrition Society. 2001, roč. 60, č. 04, s. 475-479. ISSN 0029-6651. DOI: 10.1079/PNS2001112. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665101000556
- [29] MATALANIS, Alison, Owen Griffith JONES a David Julian McCLEMENTS. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. Food Hydrocolloids [online]. 2011, č. 25, s. 1865-1880 [cit. 2014-02-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11001263>
- [30] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [31] GBASSI, Gildas K. a Thierry VANDAMME. Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. Pharmaceutics [online]. 2012, vol. 4, issue 4, s. 149-163 [cit. 2014-02-16]. DOI: 10.3390/pharmaceutics4010149. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1999-4923>
- [32] JUSTO, Oselys Rodriguez a Ângela Maria MORAES. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume. Chemical Engineering Research and Design. 2011, roč. 89, č. 6, s. 785-792. ISSN 02638762. DOI: 10.1016/j.cherd.2010.09.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263876210002856>
- [33] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. Encapsulation of polyphenols - a review. Trend in Food Science & Technology [online]. 2010, č. 21, s. 510-523 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224410001925>
- [34] TORCHILIN, V a Volkmar WEISSIG. Liposomes: a practical approach. 2nd ed. /New York: Oxford University Press, c2003, 396 s. ISBN 01-996-3654-0.
- [35] Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. NeV York: Springer Science+Business Media, LLC, 2010, 400 s. ISBN 978-144-1910-080.

- [36] MILANOVIC, J. a kol. Microencapsulation of Flavors in Carnauba Wax. *Sensors* [online]. 2010, vol. 10, issue 1, s. 901-912 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.3390/s100100901. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/>
- [37] DESAI, K. G-H. and H. JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 2005, 23(7): 1361-1394 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1081/DRT-200063478.
- [38] ZUIDAM, N. J. a NEDOVIC, V. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing [online]. London: Springer, 2009, s. 31-100 [cit. 2017-02-26]. ISBN 1441910077
- [39] ALVIM, I. D. a kol. Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components: physical characterization of microparticles. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online]. 2013, vol. 33, s. 34-39 [cit. 2017-02-26].
- [40] GOUIN, Sébastien. Microencapsulation. *Trends in Food Science* [online]. 2004, 15(7-8), 330-347 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.10.005. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224403002723>
- [41] SWARBRICK, James. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, c2007, 6 v. ISBN 08-493-9399-X.
- [42] GOUIN, Sébastien. Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2004, č. 15, s. 330-347 [cit. 2014-01-24]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403002723>
- [43] WEBSTER, T. J. Safety of Nanoparticles From Manufacturing to Medical Applications [online]. Springer Science, 2009, [cit. 2017-02-26], 239 s. ISBN 978-0-387-78607-0. Dostupný z: www.springerlink.com.
- [44] DONG, Qiu-Yue, a kol. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science* [online]. 2013, 48(7), 1339-1351 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1111/ijfs.12078. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/>
- [45] NOLLET, Leo M. L. a Fidel TOLDRÁ. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, c2013. ISBN 9781439830840.
- [46] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separce v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80.260-4243-3.
- [47] VENN, Richard F. *Principles and practice of bioanalysis*. New York: Taylor & Francis, 2000. ISBN 0748408436.
- [48] <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/hplc-troubleshooting-guide.html>
- [49] POOLE, C. F. *Gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12-385540-4.
- [50] CLEMENT, R. E. *Gas chromatography: biochemical, biomedical, and clinical applications*. New York: John Wiley and Sons, 1990, 393 s. ISBN 0471010480

8 SEZNAM ZKRATEK

Použité jednotky

- g – gram
- mg – miligram
- µg – mikrogram
- l – litr
- ml – mililitr
- h – hodina
- min – minuta
- mm – milimetr
- µm – mikrometr
- nm – nanometr
- °C – stupně Celsia

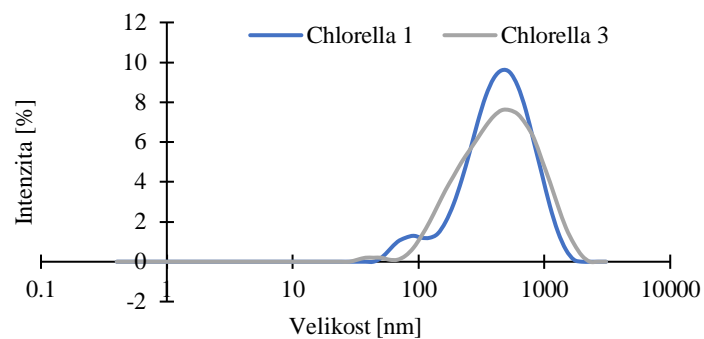
Další

- ABTS –2,2'- azino-bis-[3-etylbezo thiazolin-6-sulfonová kyselina]
- CNS – Centrální nervová soustava
- ČR – Česká republika
- D – Německo
- DLS – Dynamic light scattering
- EC – Eschericia coli
- FA – mastné kyseliny (z angl. Fatty acids)
- GC – plynová chromatografie (z angl. Gas chromatography)
- GRAS – látka obecně považována za bezpečnou (z angl. generally recognized as safe)
- HPLC–vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
- IND – Indie
- LDL – lipoprotein s nízkou hustotou (z angl. low density lipoprotein)
- Malonyl-CoA, acetyl-CoA – Malonyl-koenzym A, acetyl-koenzym A
- ML – Micrococcus luteus
- MUFA – mononenasycené mastné kyseliny (z angl. Monounsaturated fatty acids)
- PDI – polydisperzita (z angl. Polydispersity index)
- PUFA – polynenasycené mastné kyseliny (z angl. Poly Unsaturated Fatty Acids)
- RPM – otáčky za minutu (angl. Revolutions per minute)
- SE – Staphylococcus epidermis
- SFA – nasycené mastné kyseliny (z angl. Saturated fatty acids)
- SM – Serratia marcescens
- SR – Slovenská republika

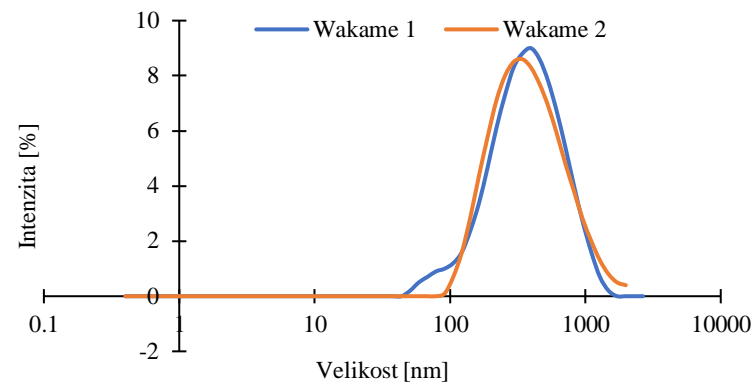
- THC – Tetrahydrokanabinol (z angl. tetrahydrocannabinol)
- UK – Velká Británie
- USA – Spojené státy americké
- UV a VIS oblast – ultrafialová viditelná oblast elektromagnetického záření (z angl. ultraviolet and visible)
- WHO – Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

9 PŘÍLOHY

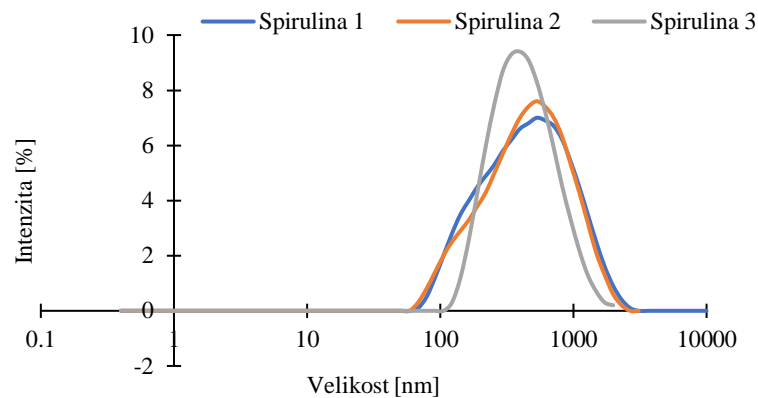
- Příloha 1: Lipozomy



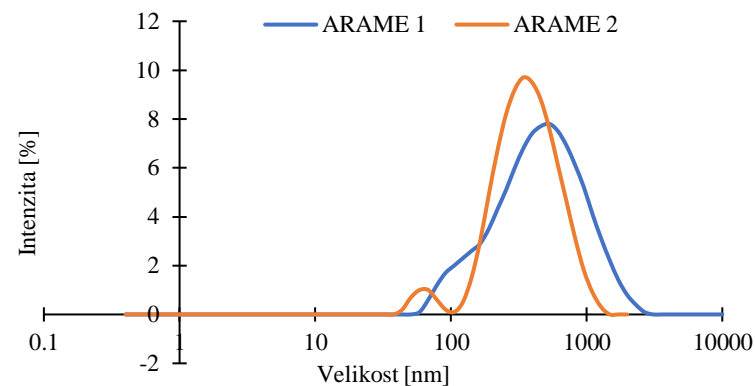
Obrázek 44: Grafická závislost velikosti lipozomů vodného extraktu Chlorelly



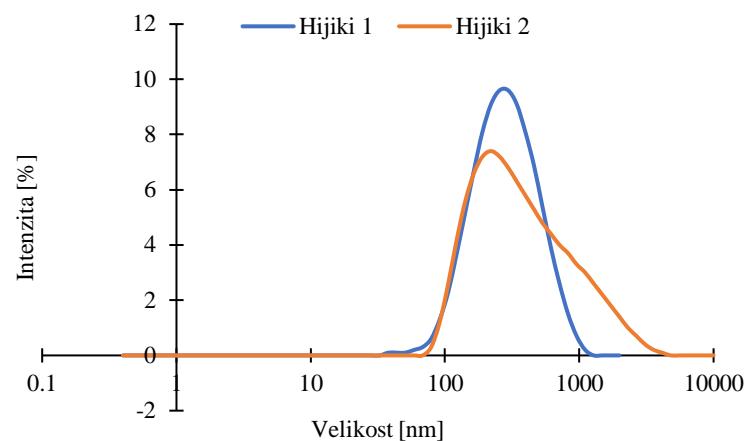
Obrázek 46: Grafická závislost velikosti lipozomů vodného extraktu Wakame



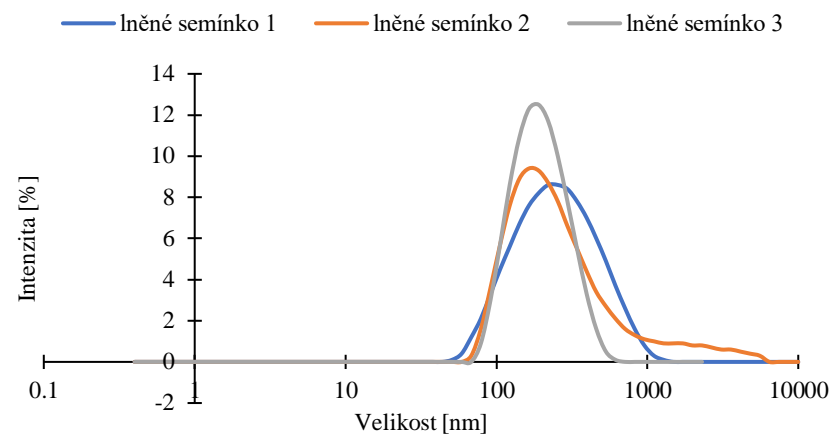
Obrázek 45: Grafická závislost velikosti lipozomů vodného extraktu Spiruliny



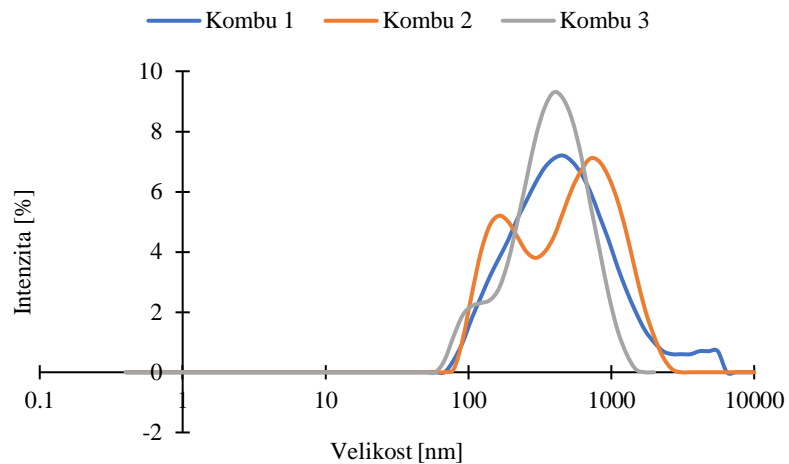
Obrázek 47: Grafická závislost velikosti lipozomů vodného extraktu Arame



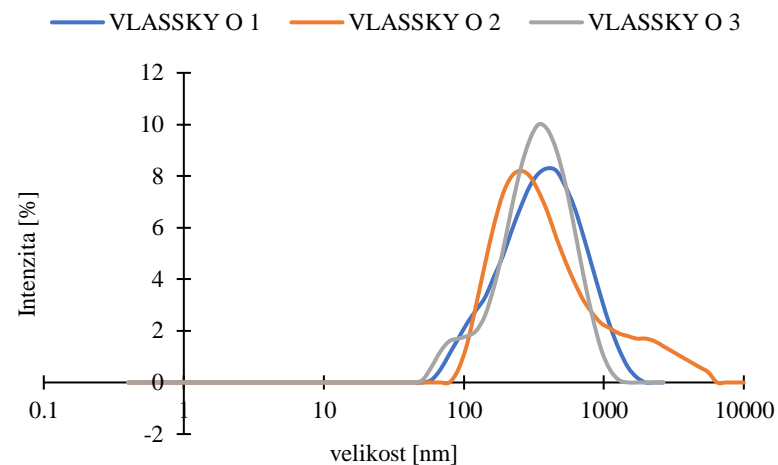
Obrázek 48: Grafická závislost velikosti lipozomů vodného extraktu Hijiki



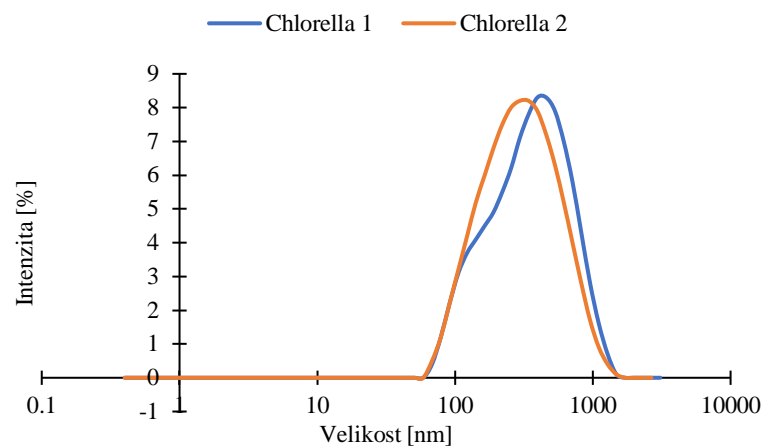
Obrázek 50: Grafická závislost velikosti lipozomů vodného extraktu Iněného semínka



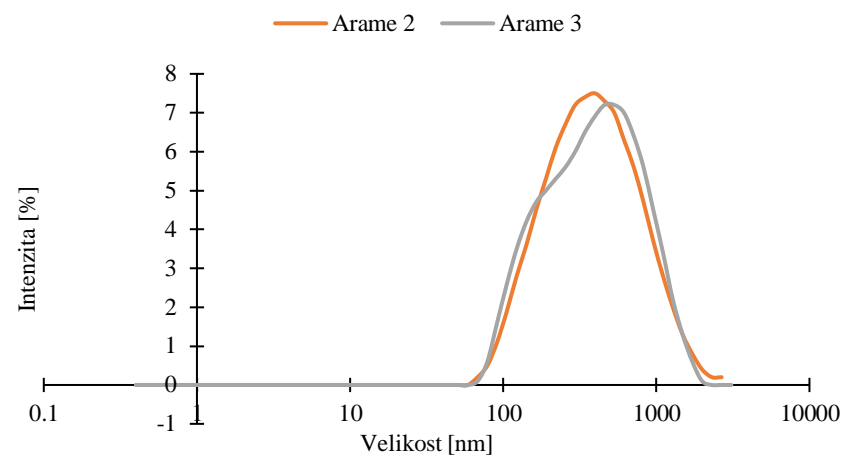
Obrázek 49: Grafická závislost velikosti lipozomů vodného extraktu Kombu



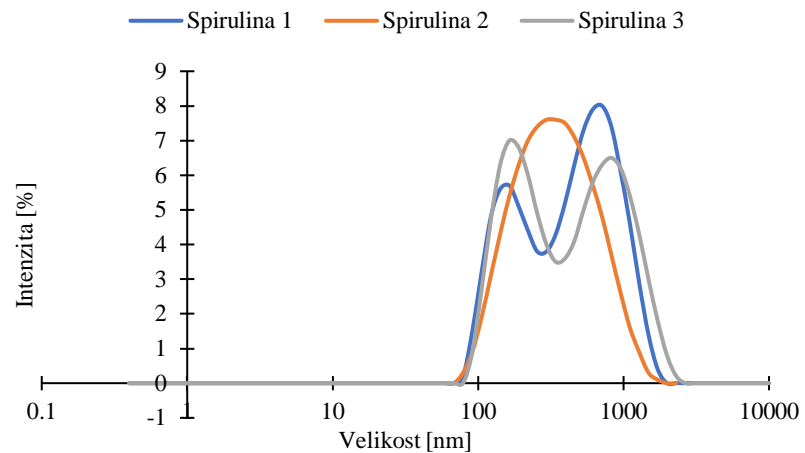
Obrázek 51: Grafická závislost velikosti lipozomů vodného extraktu vlašského ořechu



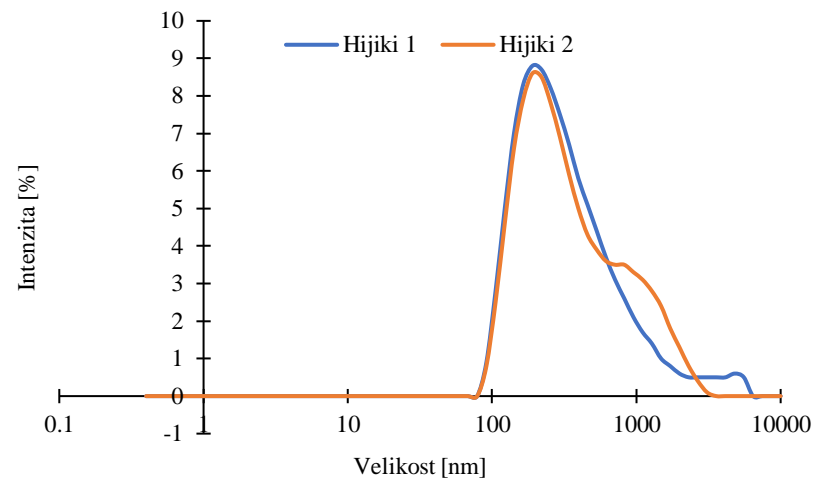
Obrázek 52: Grafická závislost velikosti lipozomů ethanolového extraktu Chlorelly



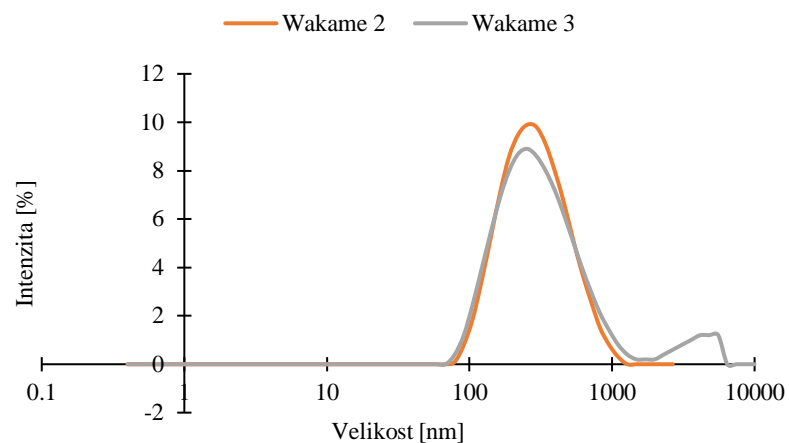
Obrázek 54: Grafická závislost velikosti lipozomů ethanolového extraktu Arame



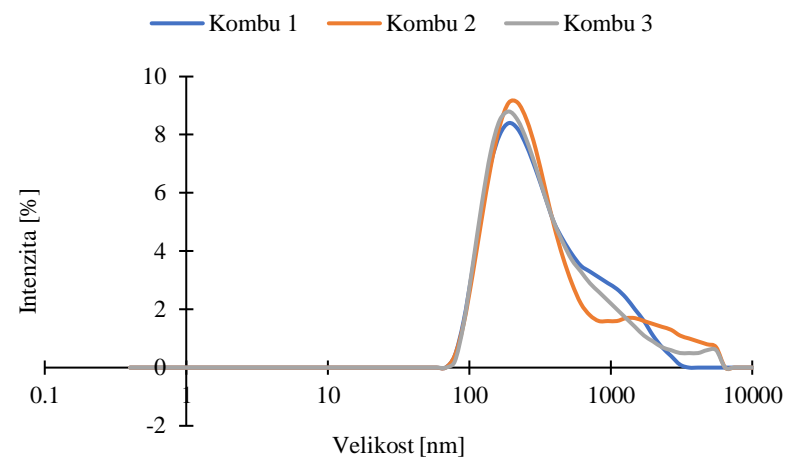
Obrázek 53: Grafická závislost velikosti lipozomů ethanolového extraktu Spirulina



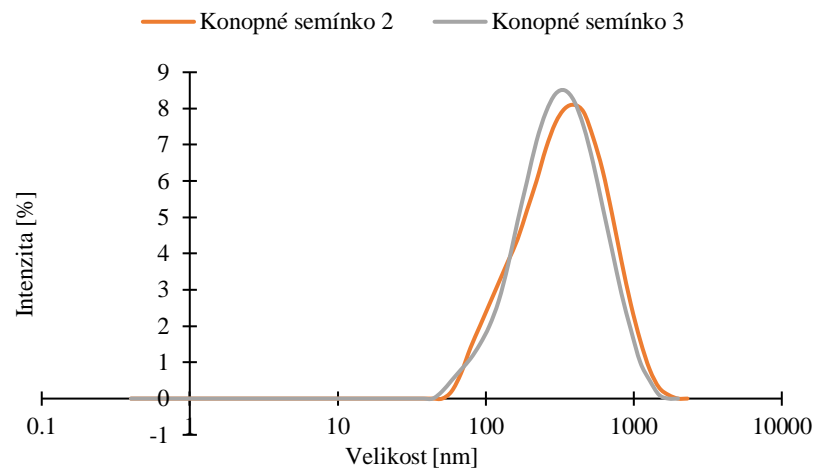
Obrázek 55: Grafická závislost velikosti lipozomů ethanolového extraktu Hijiki



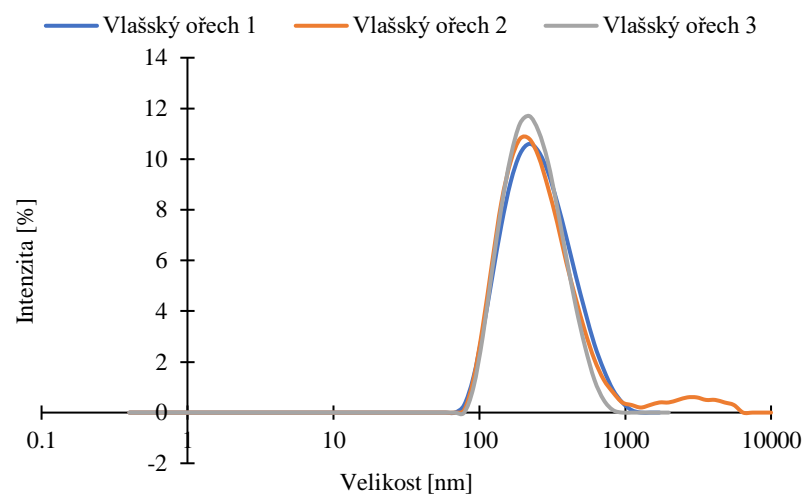
Obrázek 56: Grafická závislost velikosti lipozomů ethanolového extraktu Wakame



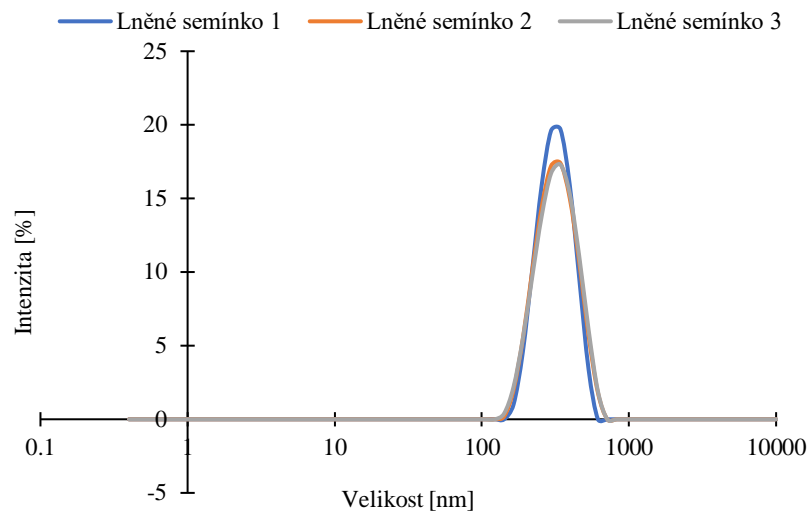
Obrázek 58: Grafická závislost velikosti lipozomů ethanolového extraktu Kombu



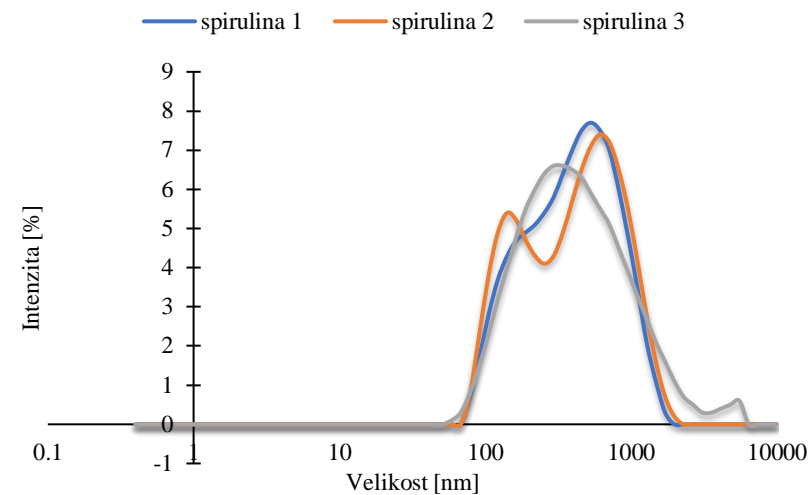
Obrázek 57: Grafická závislost velikosti lipozomů ethanolového extraktu Konopného semínka



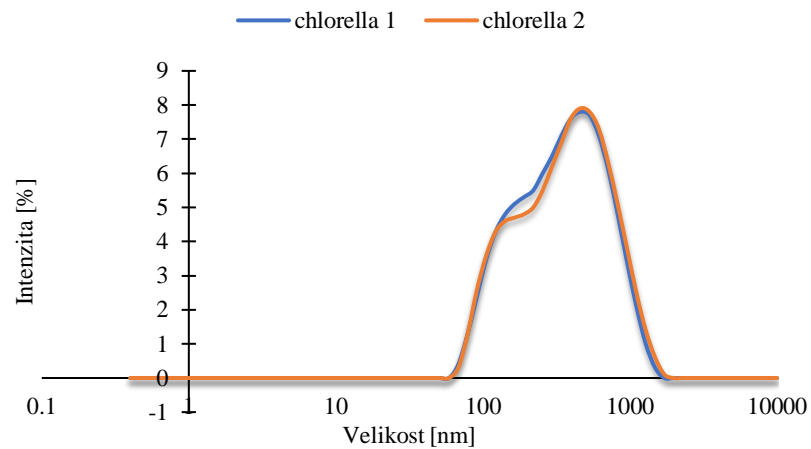
Obrázek 59: Grafická závislost velikosti lipozomů ethanolového extraktu Vlašského ořechu



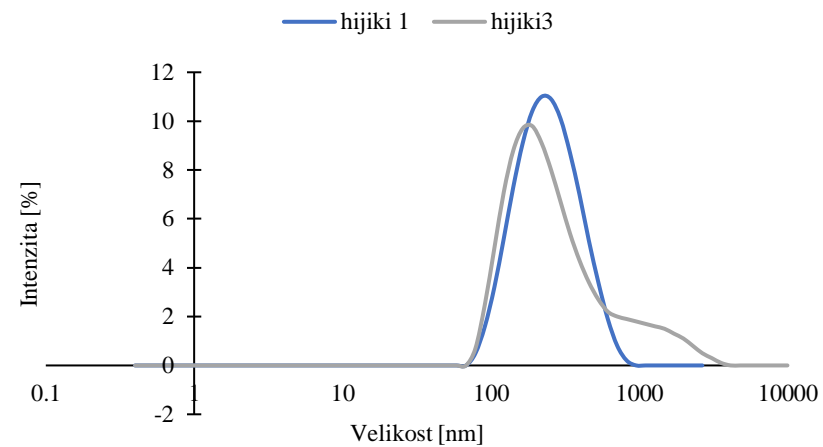
Obrázek 60: Příklad velikosti lipozomů ethanolového extraktu – Lněné semínko



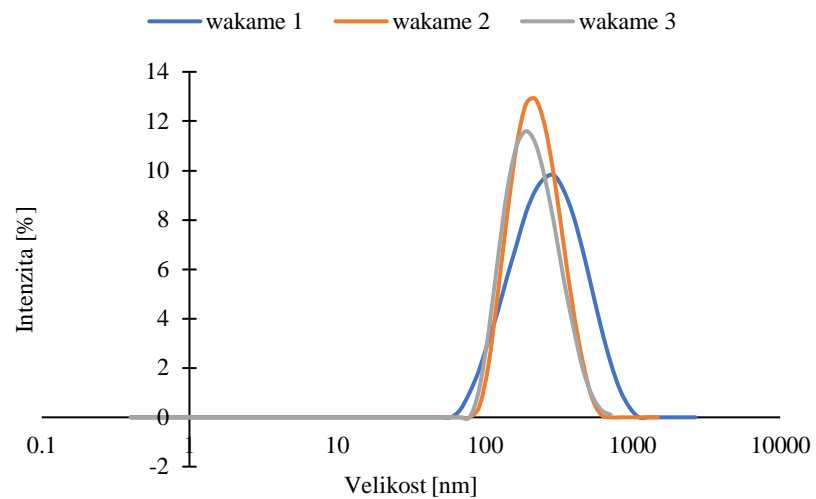
Obrázek 62: Grafické znázornění velikosti lipozomů olejového extraktu Spiruliny



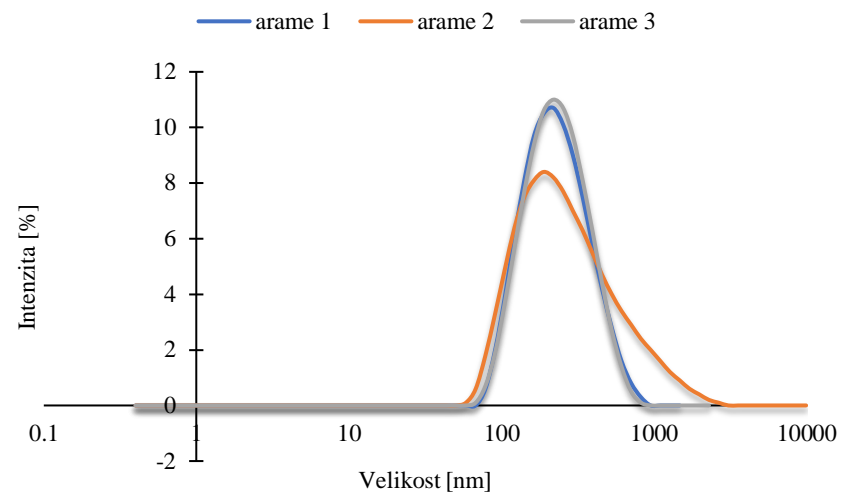
Obrázek 61: Grafické znázornění velikosti lipozomů olejového extraktu Chlorelly



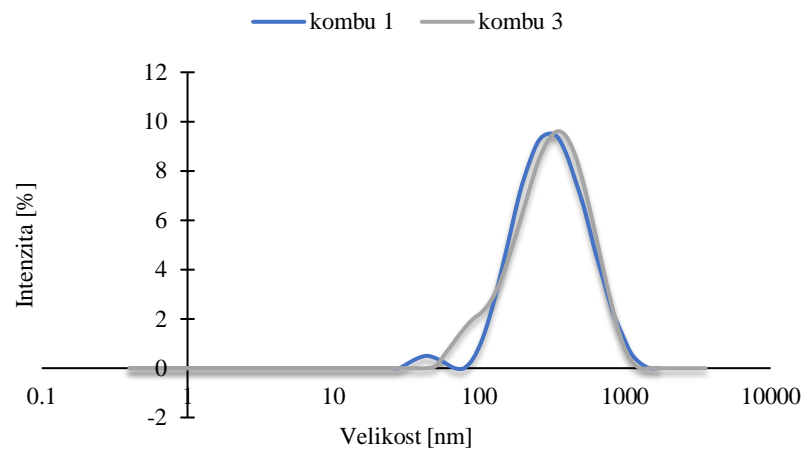
Obrázek 63: Grafické znázornění velikosti lipozomů olejového extraktu Hijiki



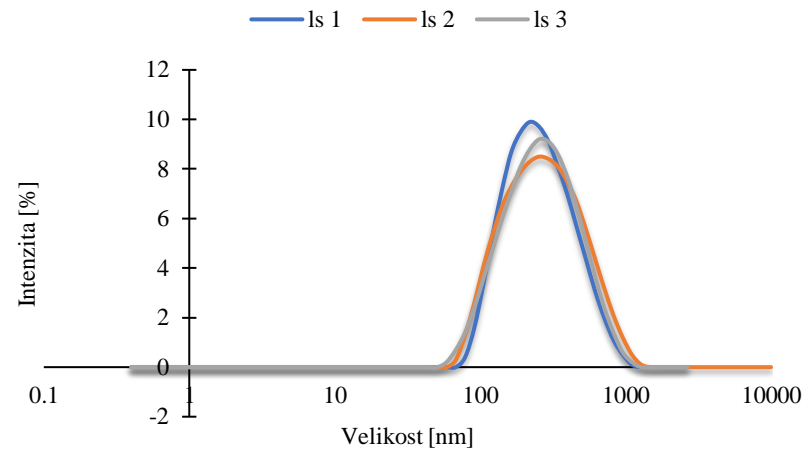
Obrázek 64: Grafické znázornění velikosti lipozomů olejového extraktu Wakame



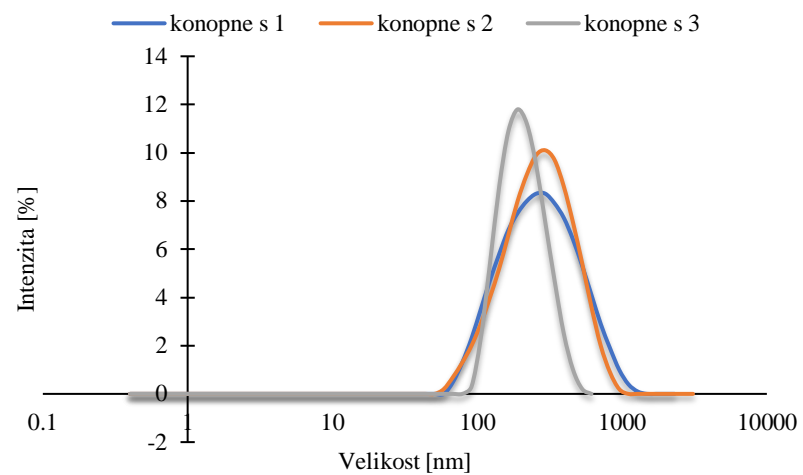
Obrázek 66: Grafické znázornění velikosti lipozomů olejového extraktu Arame



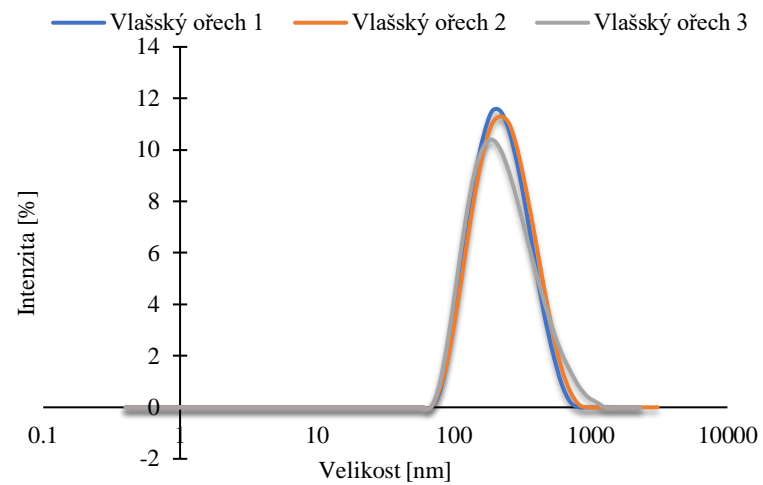
Obrázek 65: Grafické znázornění velikosti lipozomů olejového extraktu Kombu



Obrázek 67: Grafické znázornění velikosti lipozomů olejového extraktu Iněného semínka



Obrázek 68: Grafické znázornění velikosti lipozomů olejového extraktu konopného semínka



Obrázek 69: Příklad velikosti lipozomů hexanového extraktu – Vlašský ořech

- Příloha 2: Mastné kyseliny

Tabulka 37: Mastné kyseliny naměřené ve vzorcích biomasy pomocí GC

Vzorec	Název	Vzorky								
		Arame	Hijiki	Kombu	Wakame	Chlorella	Spirulina	Konopné semínko	Lněné semínko	Vlašský ořech
C12:0	k. dodekanová					✓				
C14:0	k. myristová	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
C15:0	k. pentadekanová	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓
C16:0	k. hexadekanová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C16:1	k. palmitová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:0	k. stearová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:1c	k. olejová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:1t	k. elaidová									✓
C18:2c	k. linolová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:2t	k. linolelaidová					✓		✓	✓	✓
C18:3d3	k. α -linolenová	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
C18:3d6	k. γ -linolenová	✓		✓	✓	✓	✓	✓		
C20:0	k. arachidová	✓		✓		✓		✓	✓	✓
C20:1	k. eikosanová							✓	✓	✓
C20:3d6	k. eikosatrienová			✓					✓	
C20:4	k. arachidonová	✓	✓	✓	✓					
C20:5	k. eikosapentaenová	✓	✓	✓	✓					
C21:0	k. heneikosanová					✓				
C22:0	k. behenová								✓	✓
C24:0	k. lignocerová					✓	✓		✓	✓

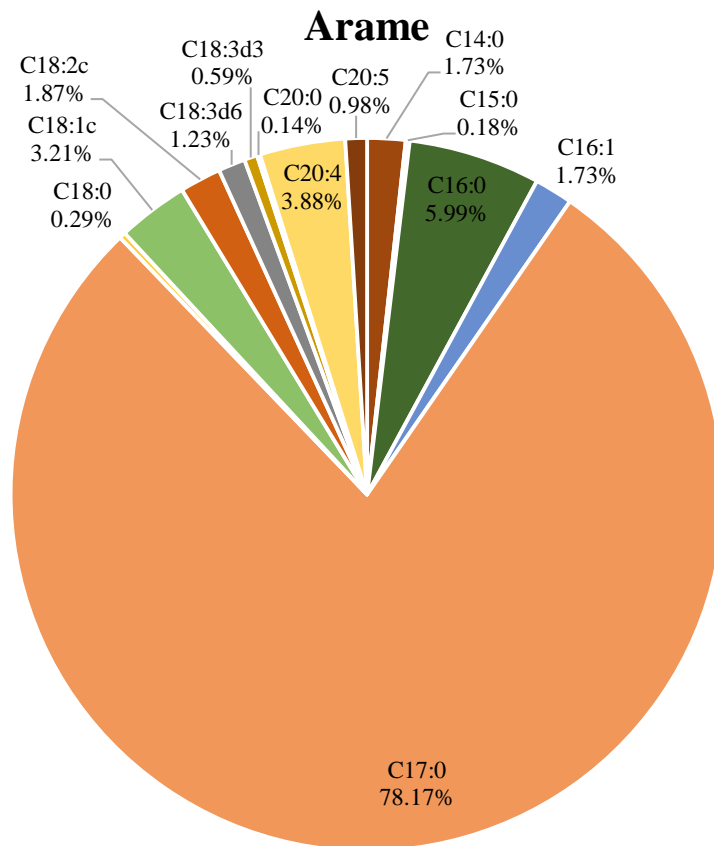
Tabulka 38: Přehled mastných kyselin naměřených v lipidových extraktech získaných pomocí přístroje soxtherm

Vzorec	Název	Vzorky								
		Arame	Hijiki	Kombu	Wakame	Chlorella	Spirulina	Konopné semínko	Lněné semínko	Vlašský ořech
C8:0	k. kaprylová		✓		✓					
C10:0	k. kaprinová				✓					
C14:0	k. myristová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C15:0	k. pentadekanová	✓	✓	✓	✓				✓	✓
C16:0	k. hexadekanová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C16:1	k. palmitová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C17:0	k. heptadekanová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C17:1	10-heptadekenová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:0	k. stearová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:1c	k. olejová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:2c	k. linolová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:2t	k. linolelaidová			✓	✓			✓	✓	✓
C18:3d3	k. α -linolenová		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C18:3d6	k. γ -linolenová			✓			✓		✓	
C20:0	k. arachidová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C20:1	k. eikosanová				✓		✓	✓	✓	✓
C20:3d6	k. eikosatrienová						✓			
C20:4	k. arachidonová	✓	✓	✓	✓		✓			
C20:5	k. eikosapentaenová	✓	✓	✓	✓					
C22:0	k. behenová		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
C22:2	k. dokosadienová			✓						
C22:6	k. dokosaheptaenová	✓								
C24:0	k. lignocerová	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

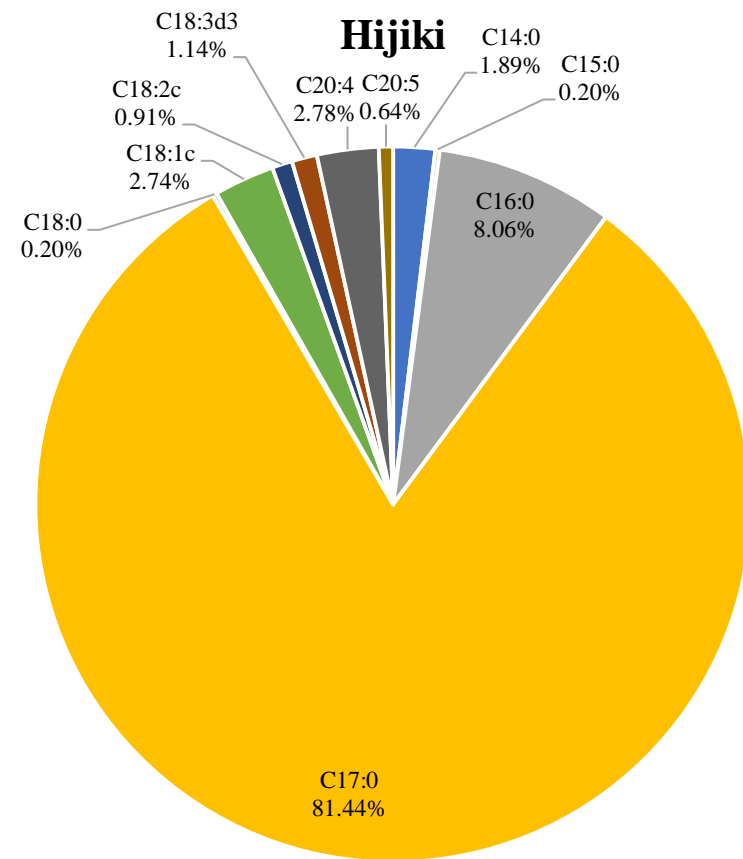
Tabulka 39: Analýza mastných kyselin v olejích listovaných za studena

Vzorec	Název	Vzorky		
		Konopné semínko	Lněné semínko	Vlašský ořech
C6:0	k. hexanová		✓	✓
C11:0	k. undekanová			✓
C12:0	k. dodekanová		✓	✓
C14:0	k. myristová	✓	✓	✓
C15:0	k. pentadekanová	✓	✓	✓
C16:0	k. hexadekanová	✓	✓	✓
C16:1	k. palmitová	✓	✓	✓
C17:0	k. heptadekanová	✓	✓	✓
C17:1	k. 10-heptadekenová	✓	✓	
C18:0	k. stearová	✓	✓	✓
C18:1c	k. olejová	✓	✓	✓
C18:2c	k. linolová	✓	✓	✓
C18:2t	k. linolelaidová	✓	✓	✓
C18:3d3	k. α -linolenová	✓	✓	✓
C18:3d6	k. γ -linolenová	✓		
C20:0	k. arachidová	✓		✓
C20:1	k. eikosanová	✓	✓	✓
C22:0	k. behenová	✓	✓	
C23:0	k. trikosanová	✓	✓	✓
C24:0	k. lignocerová	✓	✓	✓
C24:1	k. nervonová	✓		

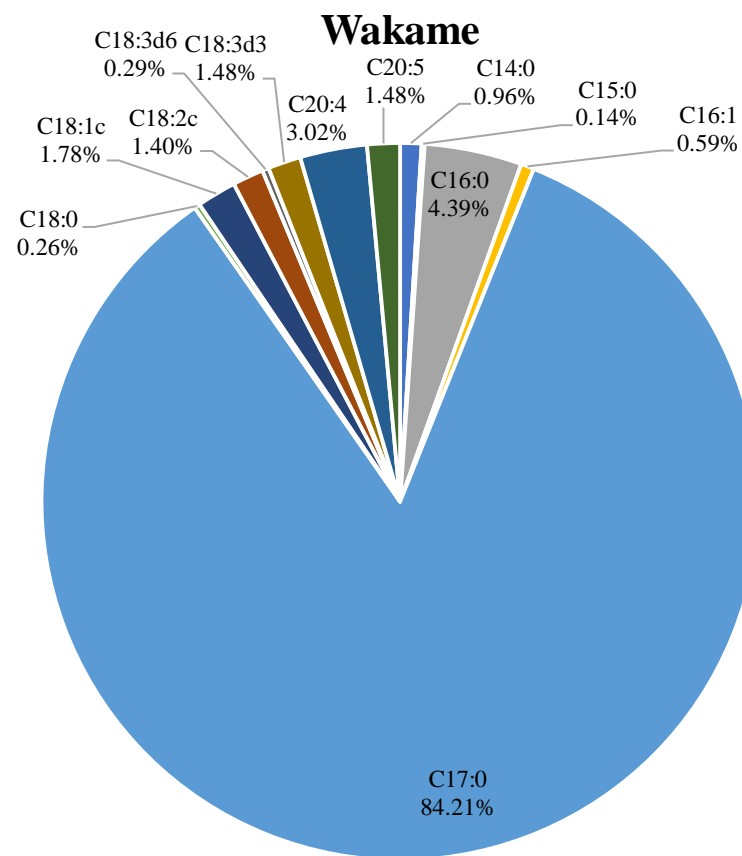
- Výsledky analýzy mastných kyselin vzorků biomasy



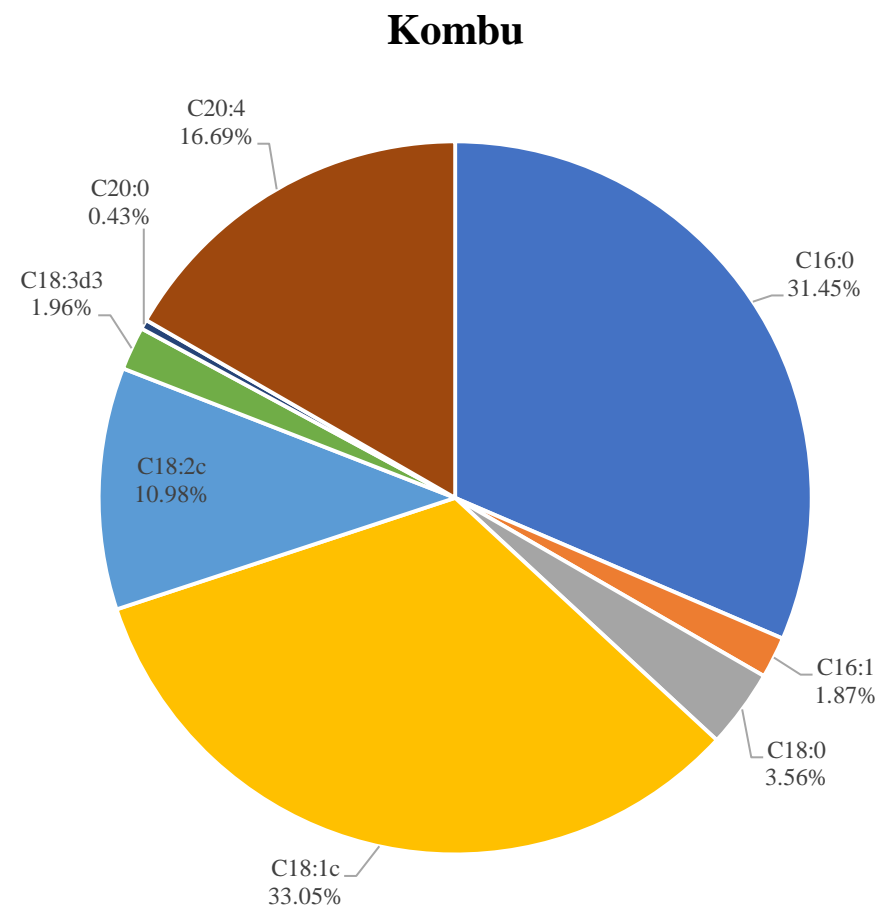
Obrázek 70: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – Arame



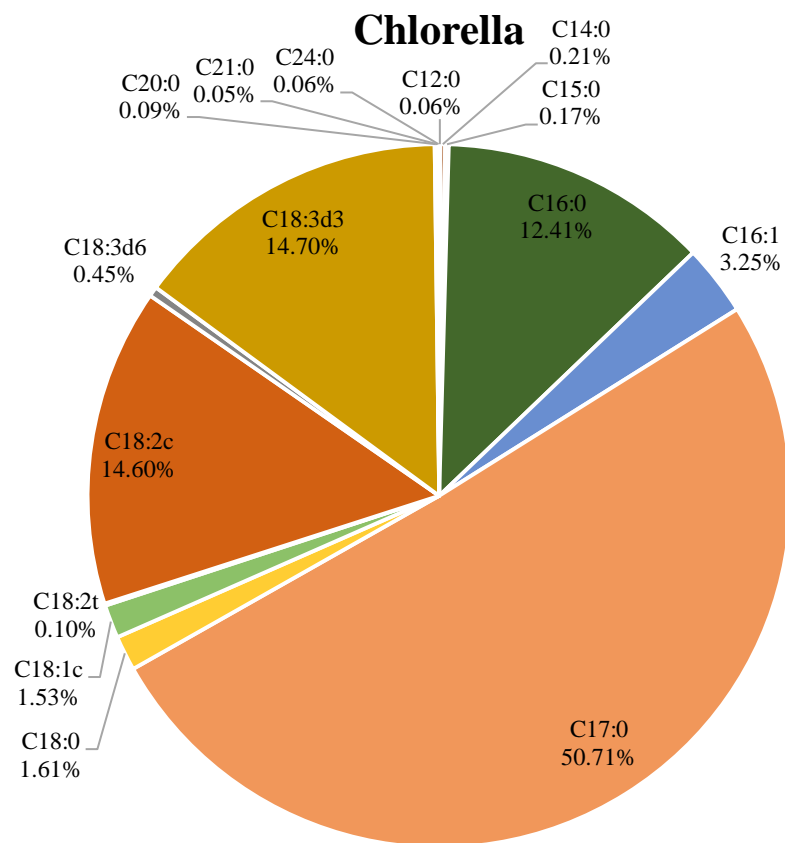
Obrázek 71: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – Hijiki



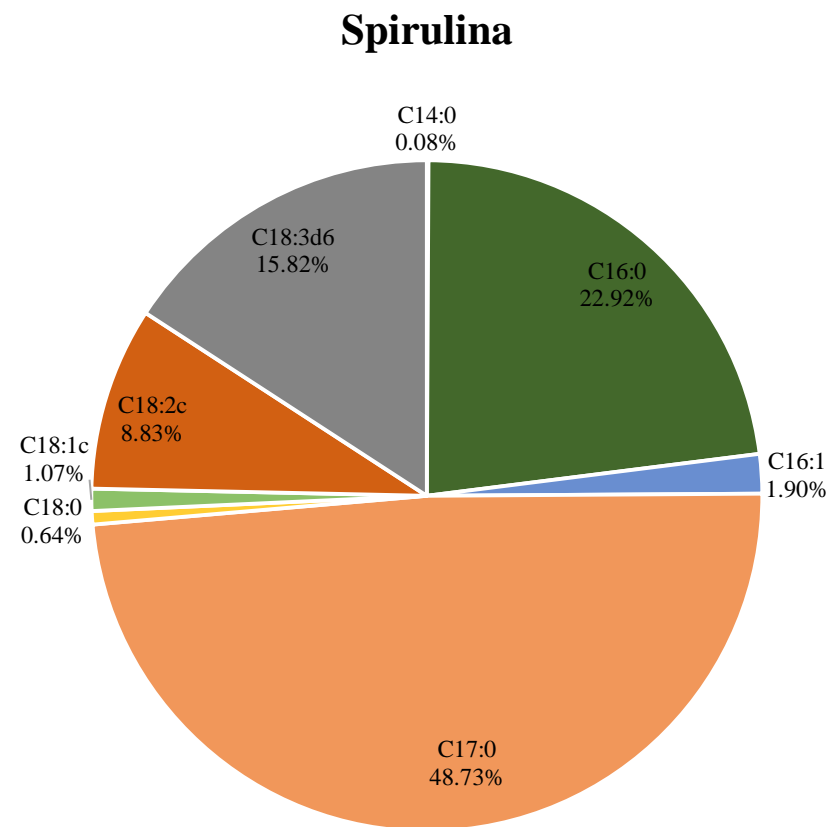
Obrázek 72: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – Wakame



Obrázek 73: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – Kombu

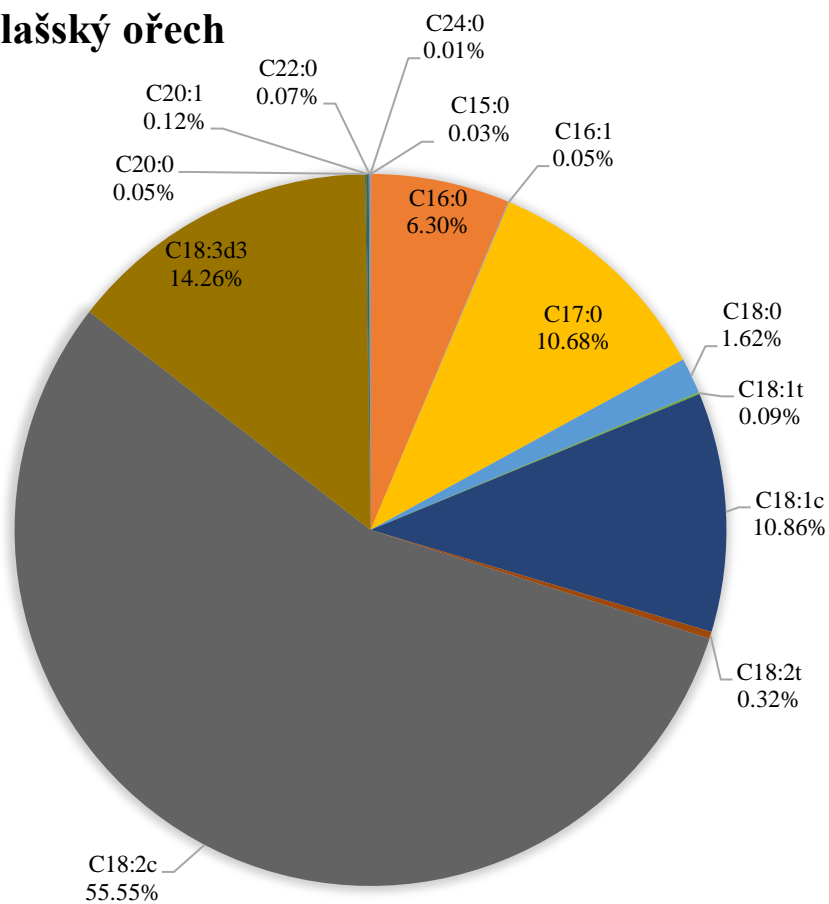


Obrázek 74: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – Chlorella



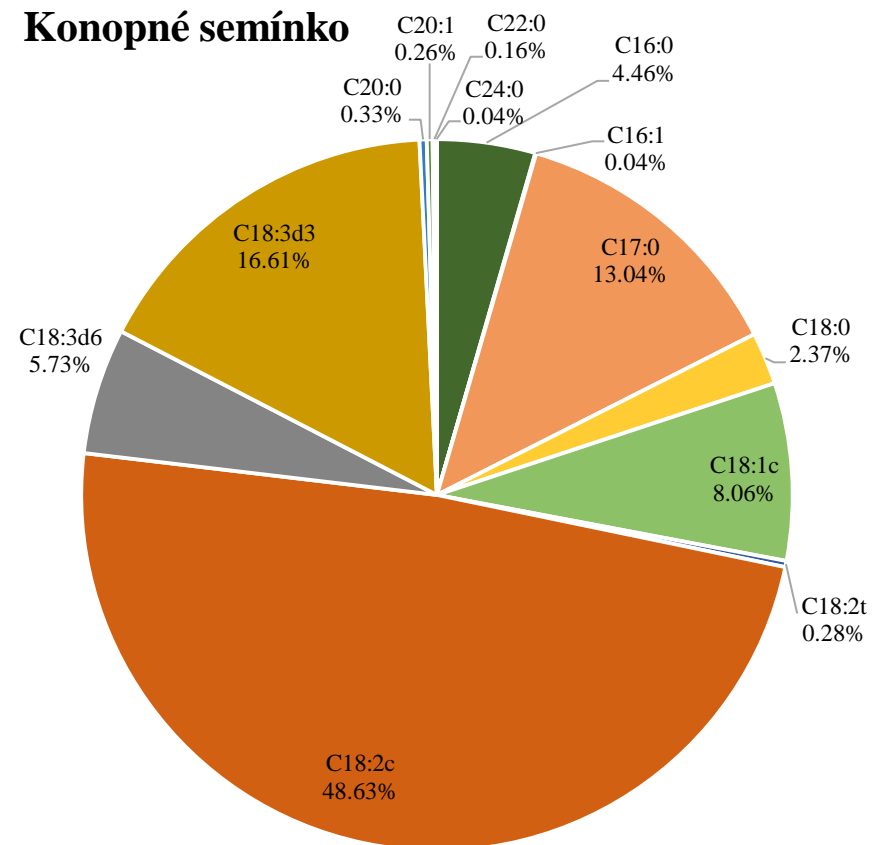
Obrázek 75: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – Spirulina

Vlašský ořech



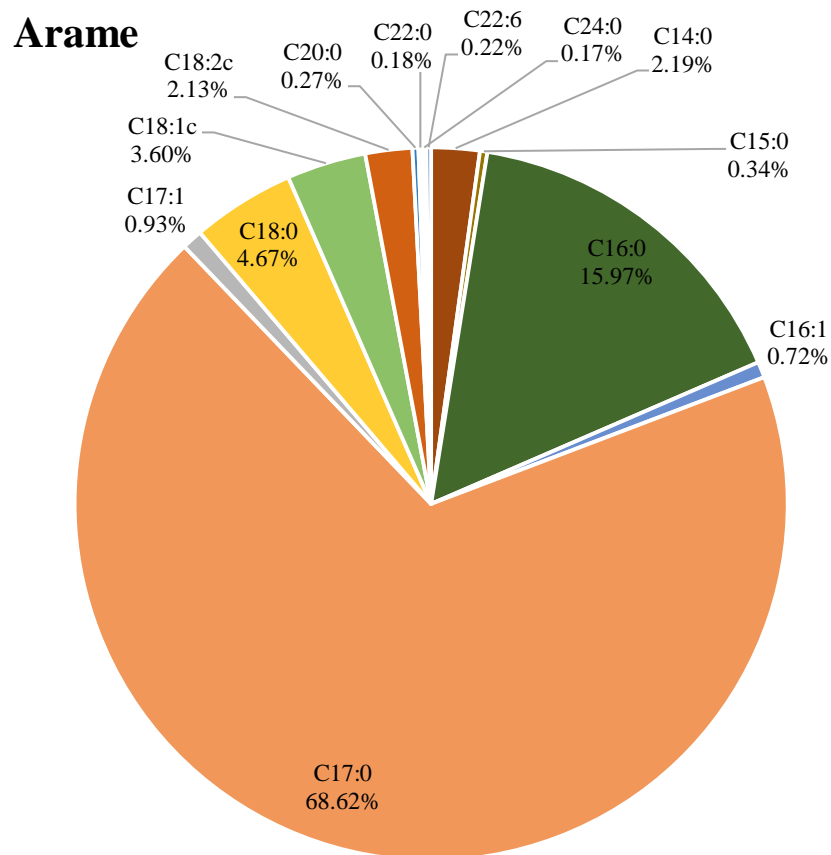
Obrázek 76: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – Vlašský ořech

Konopné semínko

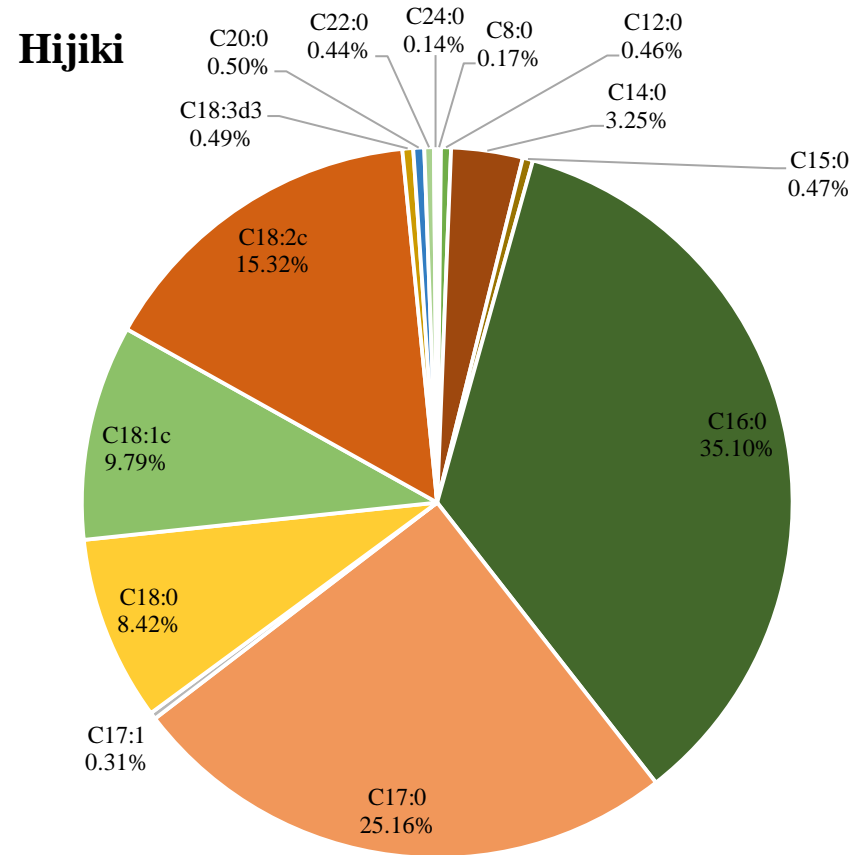


Obrázek 77: Profil mastných kyselin ve vzorku biomasy – Konopné semínko

- Výsledky analýzy mastných kyselin lipidových extraktů

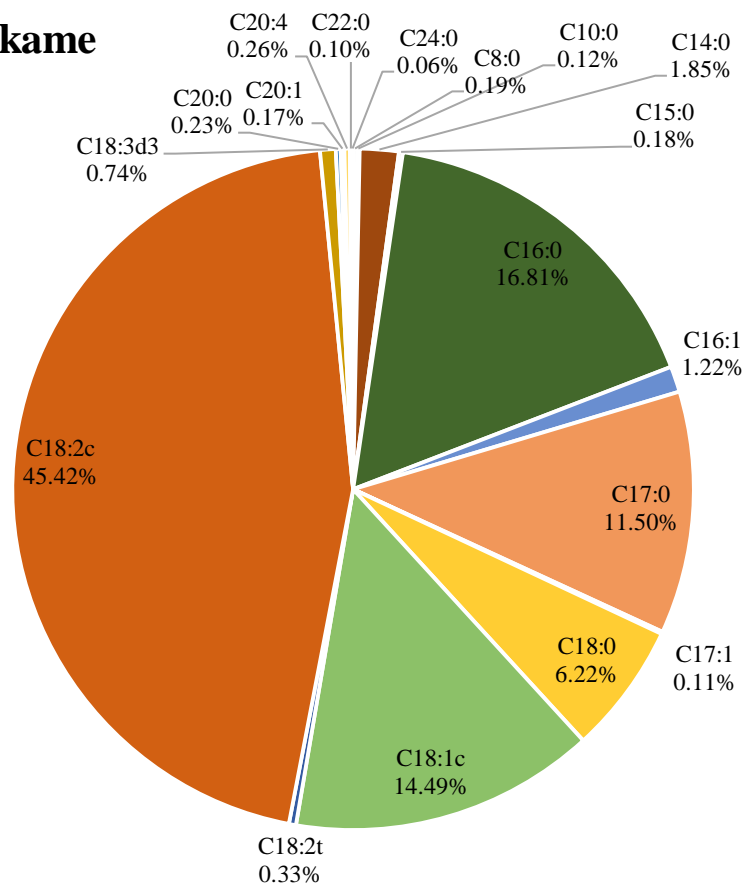


Obrázek 78: Profil mastných kyselin ve vzorcích lipidových extraktů – Arame



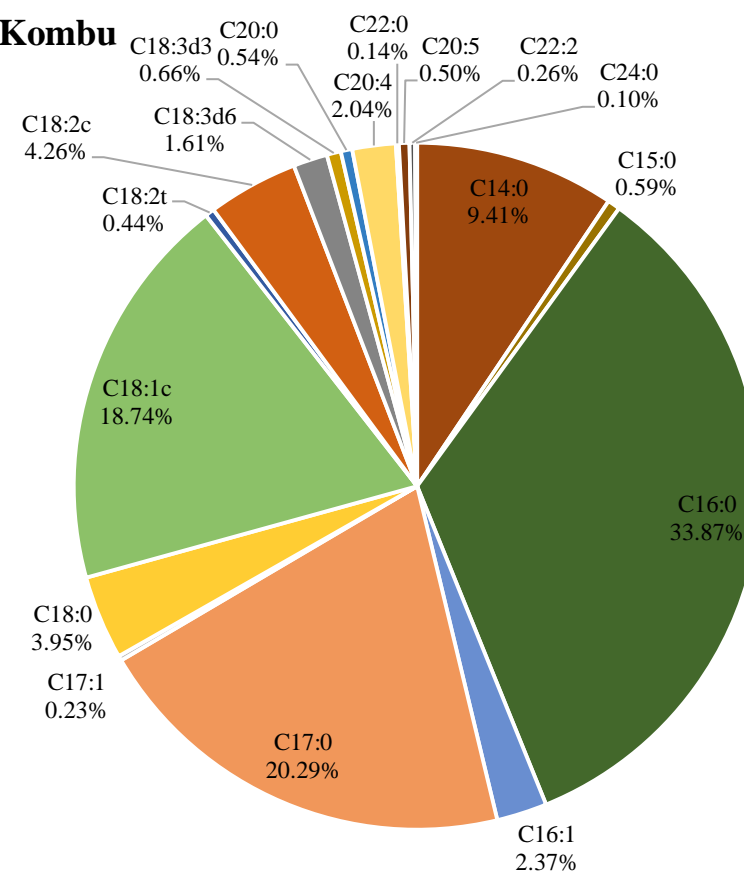
Obrázek 79: Profil mastných kyselin ve vzorcích lipidových extraktů – Hijiki

Wakame



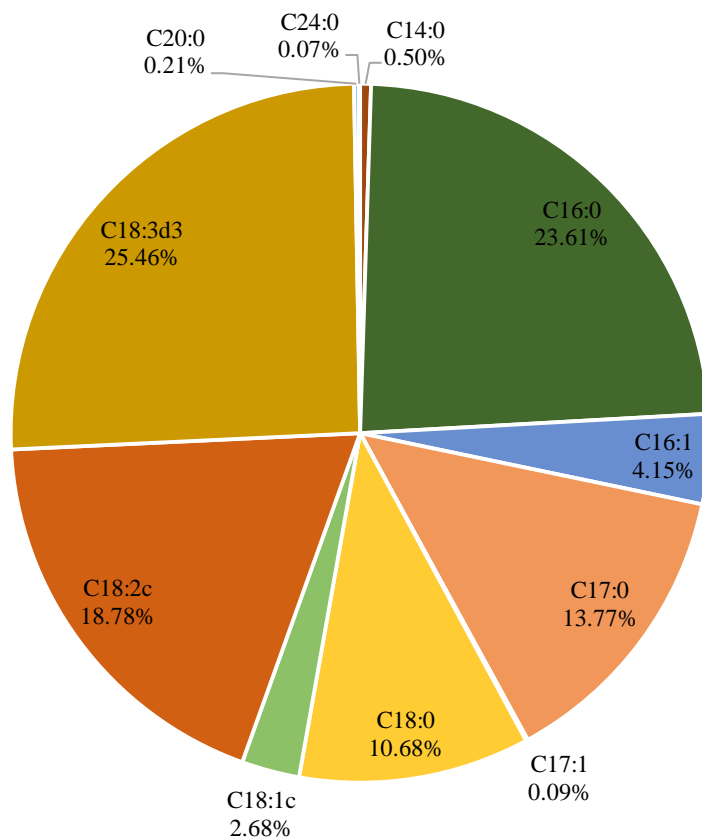
Obrázek 80: Profil mastných kyselin ve vzorcích lipidových extraktů – Wakame

Kombu



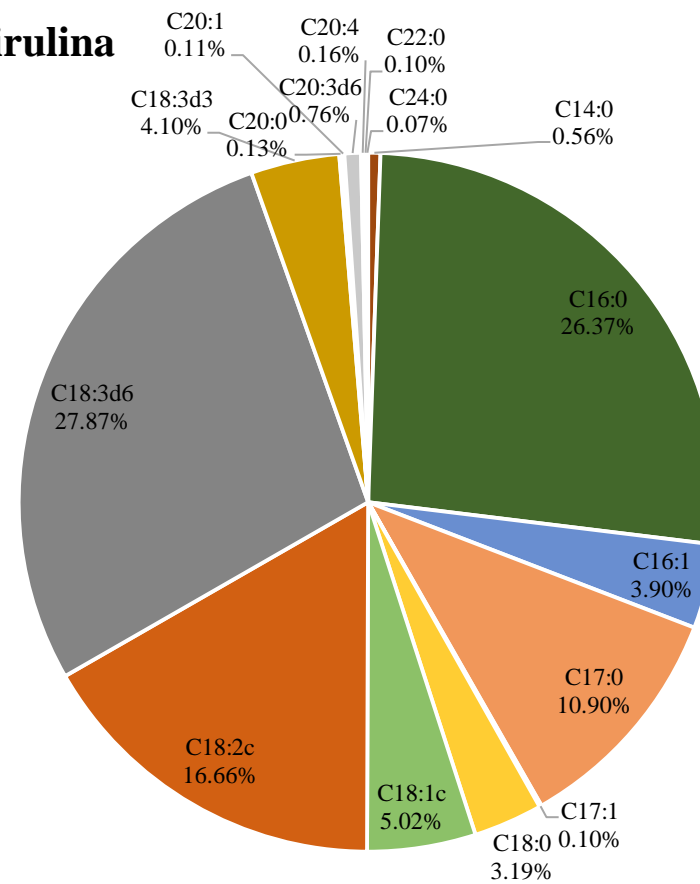
Obrázek 81: Profil mastných kyselin ve vzorcích lipidových extraktů – Kombu

Chlorella

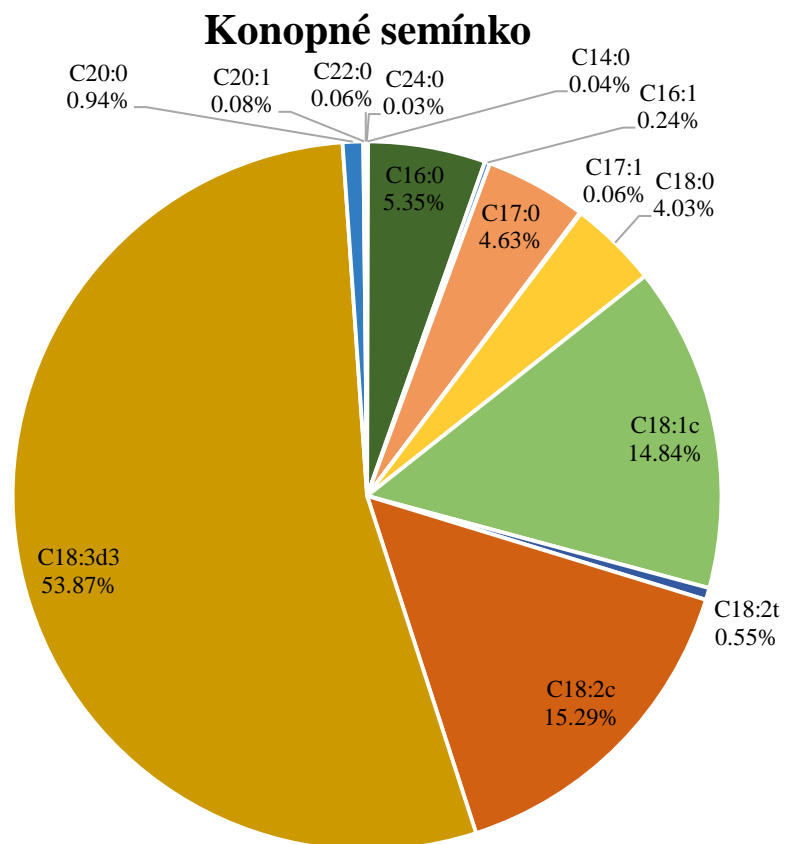


Obrázek 82: Profil mastných kyselin ve vzorcích lipidových extraktů – Chlorella

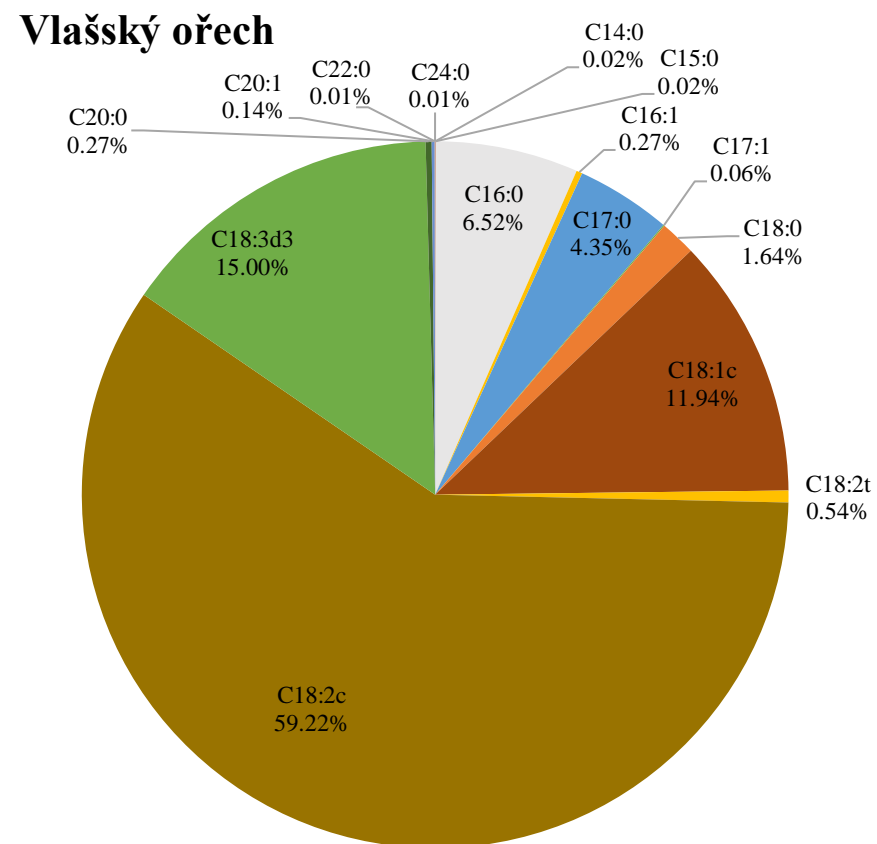
Spirulina



Obrázek 83: Profil mastných kyselin ve vzorcích lipidových extraktů – Spirulina

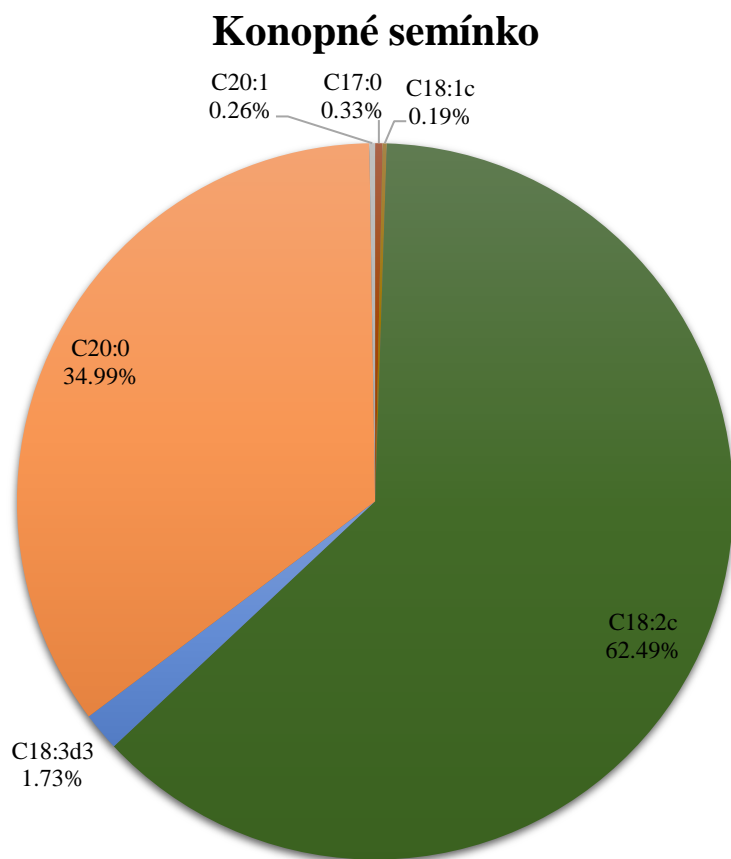


Obrázek 84: Profil mastných kyselin ve vzorcích lipidových extraktů – Konopné semínko

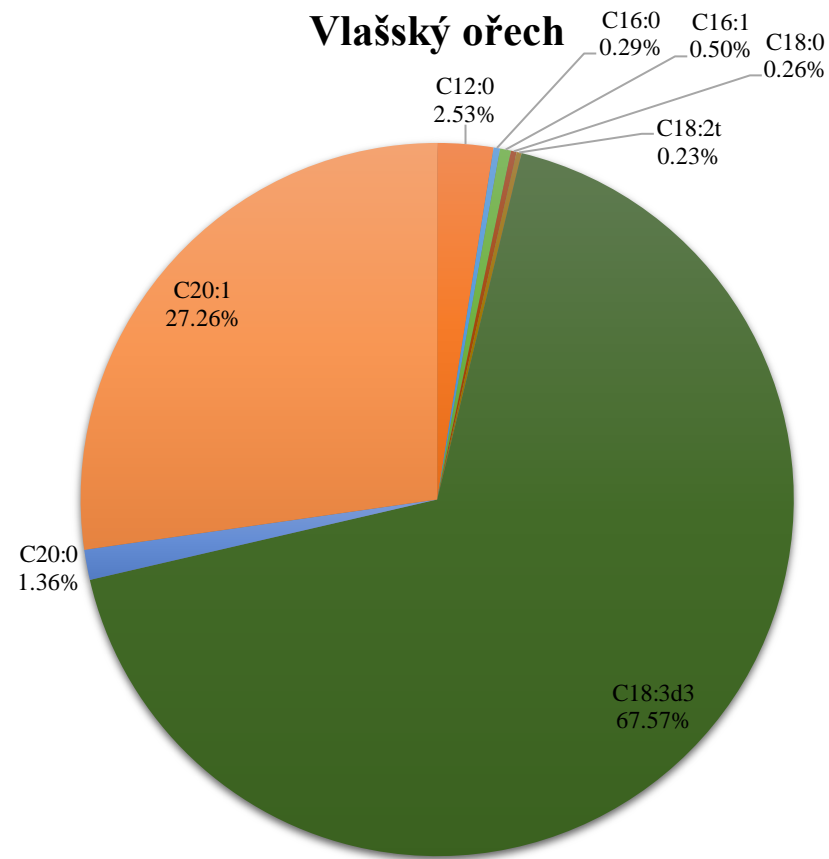


Obrázek 85: Profil mastných kyselin ve vzorcích lipidových extraktů – Vlašský ořech

- Výsledky analýz pro oleje lisované zastudena

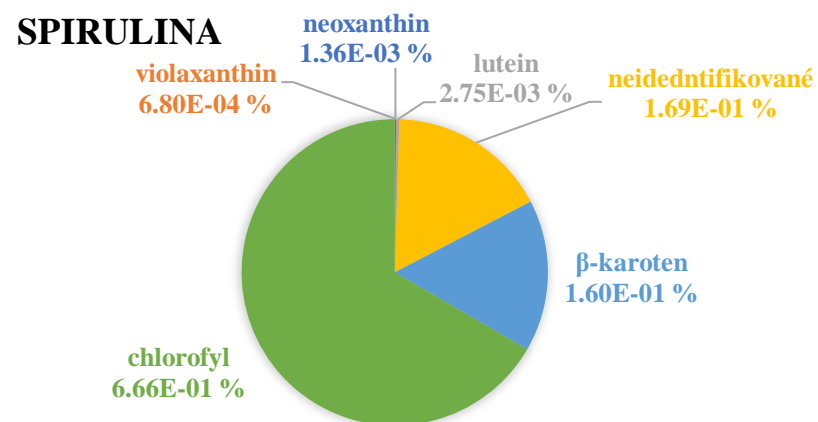


Obrázek 86: Profil mastných kyselin ve vzorcích zastudena lisovaných olejů – Konopné semínko

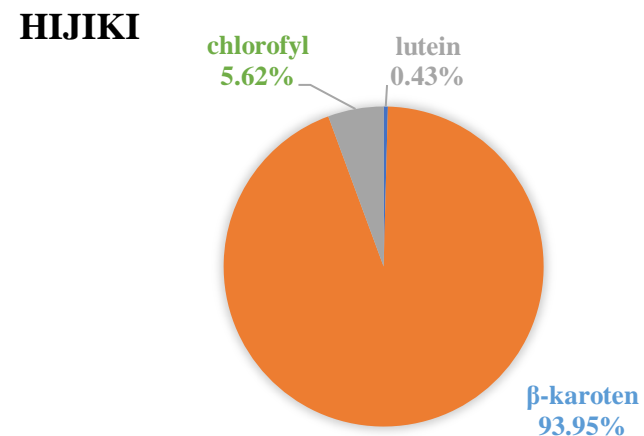


Obrázek 87: Profil mastných kyselin ve vzorcích zastudena lisovaných olejů – Vlašský ořech

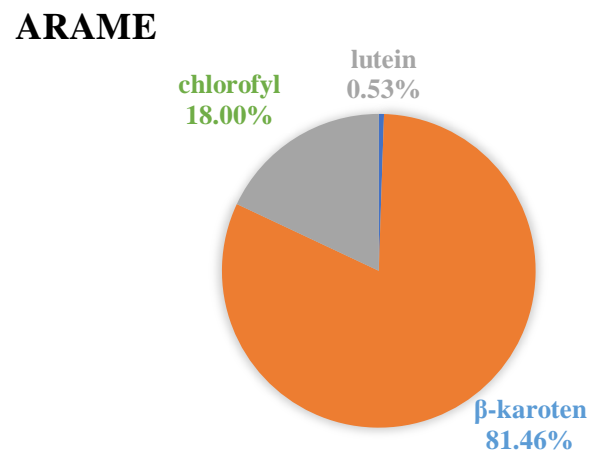
- Příloha 3: Obsah karotenoidů a chlorofylů



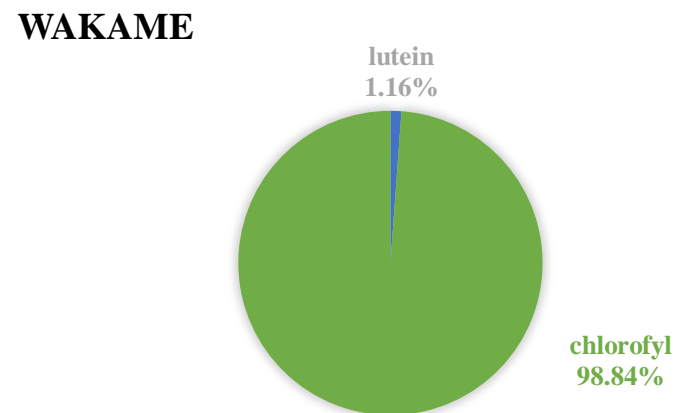
Obrázek 88: Obsah karotenoidů a chlorofylů – Spirulina



Obrázek 90: Obsah karotenoidů a chlorofylů – Hijiki

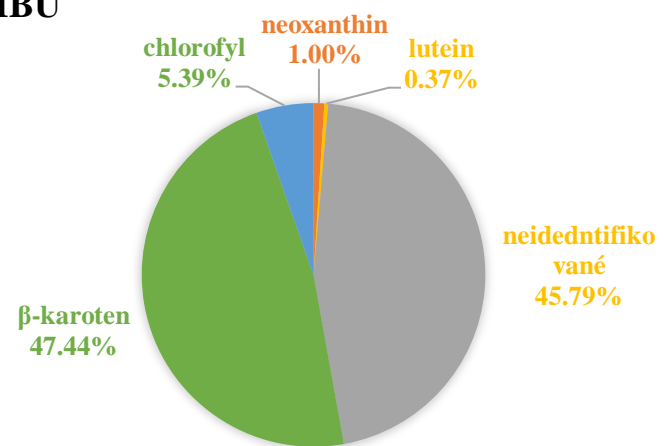


Obrázek 89: Obsah karotenoidů a chlorofylů – Arame



Obrázek 91: Obsah karotenoidů a chlorofylů – Wakame

KOMBU



Obrázek 92: Obsah karotenoidů a chlorofylů – Kombu

- Příloha 4: Dotazník pro senzorickou analýzu

Dotazník pro senzorické hodnocení doplňků stravy

Vážení hodnotitelé,
zhodnoťte, prosím, předložené vzorky doplňků stravy.

Hodnotitel:

Datum:

Čas:

Zdravotní stav: kuřák/nekuřák muž/žena

Jaké je Vaše stanovisko před ochutnáváním? (Želatinové bonbóny)

- a) Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny mám velmi rád/a
- b) Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny nemám příliš rád/a
- c) Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny vůbec rád/a

Jaký máte vztah k doplňkům stravy s obsahem omega mastných kyselin?

- a) Doplňky stravy využívám často
- b) Doplňky stravy spíše nevyžívám
- c) Doplňky stravy vůbec nevyžívám

Senzorické hodnocení vzorků pomocí stupnice (jako ve škole):

- 1. Vynikající
- 2. Velmi dobrá
- 3. Dobrá
- 4. Spokojivá
- 5. Nevyhovující

Kód vzorku	Vzhled a barva	Chuť	Vůně	Konzistence	Celkové hodnocení

Konzistence (textura)

(hodnoťte zmáčknutím mezi prsty, potom v ústech při ukousnutí a žvýkání)

Kód vzorku	Konzistence	Označte nejlepší vzorek	Označte nejhorší vzorek

- 1. Příliš měkká
- 2. Měkká
- 3. Střední
- 4. Tvrdá
- 5. Příliš tvrdá (tuhá)

Pořadový test

Číslo pořadí	Kód vzorku	Poznámka